

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Farmacología



TESIS DOCTORAL

**Mecanismos moleculares asociados al escape de albuminuria
en pacientes con supresión crónica del sistema renina
angiotensina: un abordaje traslacional**

**Molecular mechanisms associated to albuminuria escape in
patients under chronic ras blockade: a translational approach**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Helena Pulido Olmo

Directoras

Marisol Fernández Alfonso

M^a Isabel Aránguez Alonso

Gema Ruiz Hurtado

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Dpto. de FARMACOLOGÍA



**MECANISMOS MOLECULARES ASOCIADOS AL ESCAPE DE ALBUMINURIA
EN PACIENTES CON SUPRESIÓN CRÓNICA DEL SISTEMA RENINA
ANGIOTENSINA: UN ABORDAJE TRASLACIONAL**

***MOLECULAR MECHANISMS ASSOCIATED TO ALBUMINURIA ESCAPE IN
PATIENTS UNDER CHRONIC RAS BLOCKADE: A TRANSLATIONAL
APPROACH***

TESIS DOCTORAL

Helena Pulido Olmo

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Dpto. de FARMACOLOGÍA



**MECANISMOS MOLECULARES ASOCIADOS AL ESCAPE DE ALBUMINURIA
EN PACIENTES CON SUPRESIÓN CRÓNICA DEL SISTEMA RENINA
ANGIOTENSINA: UN ABORDAJE TRASLACIONAL**

***MOLECULAR MECHANISMS ASSOCIATED TO ALBUMINURIA ESCAPE IN
PATIENTS UNDER CHRONIC RAS BLOCKADE: A TRANSLATIONAL
APPROACH***

TESIS DOCTORAL

Memoria que presenta

Helena Pulido Olmo

para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Directores:

Marisol Fernández Alfonso, M^a Isabel Aránguez Alonso y Gema Ruiz Hurtado

Madrid, 2016



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Dpto. de Farmacología

Dña. MARISOL FERNÁNDEZ ALFONSO, Catedrática del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, Dña. ISABEL ARÁNGUEZ ALONSO, Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid y Dña. GEMA RUÍZ HURTADO, Investigadora del Instituto de Investigación imás12 del Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid,

CERTIFICAN:

Que Dña. HELENA PULIDO OLMO ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “Mecanismos moleculares asociados al escape de albuminuria en pacientes con supresión crónica del sistema renina angiotensina: un abordaje traslacional” con objeto de obtener el Grado de doctor.

Y para que así conste a todos los efectos, firmamos el presente certificado en Madrid, a 21 de Junio de 2016.

Fdo: Marisol Fernández Alfonso

Fdo: Isabel Aránguez Alonso

Fdo: Gema Ruiz Hurtado

A mi familia

A Álex

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, gracias a mis directoras, Marisol, Isabel y Gema. Gracias por haber confiado en mi desde el primer momento, y muchas veces más de lo que yo confiaba en mi misma. Gracias por todo lo que me habéis enseñado, tanto dentro como fuera del laboratorio, por vuestros consejos, por vuestro apoyo, por vuestro cariño y vuestra dedicación. Gracias por ser más que unas directoras de tesis para mi.

Gracias a mis compañeros del Pluri, por acogerme y compartir cada día de esta andadura. Gracias a Rubén, Pablo, Ahmed, Uxía, Pablo, Eva, Paqui, José Antonio, Miguel Ángel, Quique, Ana, Cristina, Susana, Raquel... por los buenos momentos compartidos en los descansos, en las comidas, por las quedadas...

Gracias a la gente del CEU. Gracias a Bea, por todos tus consejos, por ayudarme siempre que lo he necesitado, por enseñarme tanto. Gracias a Concha, por estar ahí desde el principio, por toda tu paciencia y ayuda, por tantas risas compartidas, por los buenísimos momentos en los congresos, por tu amistad... Gracias a Miriam, a Marta, a Danila por vuestra ayuda pero sobre todo por tantos buenos momentos, por tantas risas.

Gracias a la gente de la Autónoma. Gracias a Silvia y a Maricarmen por abrirme las puertas de vuestro laboratorio. Gracias a Perla y a David, por los buenos momentos, por hacerme sentir una más. Gracias a Pilar, por compartir tantísimo conmigo, las risas y los lloros, por tantos momentos de desahogo, por estar siempre... Gracias por ser una de las mejores amigas que se pueden tener.

Gracias a la gente del 12, por la buena acogida. Gracias a mis nuevos compañeros, a Jenni y a Alberto, por el buenísimo ambiente que habéis ayudado a crear en el labo, por hacerme sentir tan a gusto. Gracias a la gente de la Unidad de Hipertensión, al Dr. Ruilope, al Dr. Segura, a Lucía... por vuestra ayuda. Gracias a las chicas del laboratorio de Nefrología, por hacer que me sintiera siempre como una más.

Gracias a toda la gente de Glasgow. Gracias a la Profesora Touyz por acogerme en su laboratorio, por darme la oportunidad de vivir esta experiencia. Gracias a la gente del labo, a Guto, Fran, Jackie, Aurelie, Sofia, Caterina, Andy, Maria, Lluís, Nic, Carol, Wendi, Panagiota... y por supuesto a Allegra. Gracias a todos por hacerme sentir como en casa, incluso antes de que llegase, gracias por todo lo que me habéis enseñado, por compartir conmigo esos meses y ser mis amigos además de mis compañeros, por ayudar a hacer que fuese una de las mejores

experiencias que he tenido. Gracias a las chicas de la residencia, gracias a Martina por ser mi amiga desde el principio.

Gracias a mis amigas de toda la vida. Gracias a mis boticarias, a Sara, a Ana, a Alicia y a Nuria por hacer que el tiempo no pase, porque aunque nos veamos poco, cada vez que quedamos me hacéis sentir que los problemas no existen. Gracias a Dani, por tu interés, tu empatía y tu buen humor. Por supuesto gracias a mis amigas del cole, gracias a Vanessa y a Cristina, porque habéis compartido todo conmigo, gracias por estar ahí siempre, por vuestros ánimos, por vuestras palmaditas en la espalda, por escucharme y apoyarme siempre. Gracias a todas por ser las mejores.

Gracias a Yamila y a mis compis de los viernes por la tarde, por llenarme de energía y optimismo por hacer que, independientemente de cómo hubiese ido la semana, el fin de semana siempre empezase con una sonrisa.

Gracias a Álex, por ser un pilar fundamental en mi vida, por compartirlo todo conmigo, lo bueno y lo menos bueno. Por tus ánimos, por tus consejos, por tus sonrisas, por estar ahí siempre que lo he necesitado, por tener la palabra oportuna en todo momento, aunque ni yo misma supiera cuál era. Pero sobre todo, por hacerme sentir que los logros son más logros y las dificultades menos difíciles, por hacerme creer que soy capaz de todo y por estar siempre a mi lado para ayudarme a alcanzarlo.

Y por último gracias a mi familia. Gracias a mi abuela por alegrarte siempre con mis logros, por sentirte tan orgullosa de tu nieta. Gracias a Auro, simplemente por ser mi hermana, con todo lo que eso conlleva, que no es poco. Gracias por aguantarme, por tu alegría, por compartir conmigo tanto, por estar ahí siempre. Y finalmente gracias a mis padres, Juan y M^a José. ¿Por dónde empiezo? Gracias por hacer esto posible, por enseñarme a no ponerme límites, por apoyarme y empujarme hacia adelante. Por estar siempre ahí, por ser los mejores consejeros, por enseñarme tantísimo, por hacer desde siempre que quisiera ser mejor y ayudarme a lograrlo. Por vuestra ayuda en todo momento, por haber estado a mi lado para que consiguiese todo lo que me he propuesto y sobre todo por haber hecho posible que hoy sea quien soy.

En definitiva, gracias a todos los que de una manera u otra habéis formado parte de estos años de mi vida.

ÍNDICE

Páginas

Abreviaturas

Resumen

3

Abstract

11

INTRODUCCIÓN

1	Enfermedad cardiovascular y renal	19
1.1	Enfermedad cardiovascular	19
1.2	Enfermedad renal	19
1.3	Factores de riesgo de enfermedad cardiovascular y renal	20
1.4	Relación entre enfermedad cardiovascular y renal. Continuo Cardiorenal	20
2	Hipertensión arterial como factor de riesgo cardiovascular y renal	22
2.1	Hipertensión como factor de riesgo cardiovascular	23
2.1.1	Consecuencias de la hipertensión a nivel vascular	24
2.1.1.1	Estructura de la pared arterial	24
2.1.1.2	Disfunción endotelial	24
2.1.1.3	Rigidez arterial	25
	Mecanismos subyacentes a la aparición de rigidez arterial	26
2.2	Hipertensión como factor de riesgo renal	26
3	Albuminuria como factor de riesgo renal y cardiovascular	28
3.1	Albuminuria como factor de riesgo renal	28
3.2	Albuminuria como factor de riesgo cardiovascular	29
3.3	Estructura y fisiopatología de la nefrona	30
3.3.1	Barrera de filtración glomerular y desarrollo de albuminuria	31
3.3.1.1	Endotelio glomerular fenestrado	32
3.3.1.2	Matriz extracelular glomerular	33
	Laminina	34
	Colágeno tipo IV	34
	Proteoglicanos de heparán sulfato	34
	Nidógeno	35
	Receptores de adhesión de matriz extracelular-célula	35
3.3.1.3	Podocitos	35

3.3.1.4 Relación entre los distintos componentes de la barrera de filtrado glomerular	36
3.3.2 Túbulo renal y desarrollo de albuminuria	37
3.4 Causas de la albuminuria asociadas con la hipertensión	37
3.4.1 Aumento de la presión hidrostática glomerular	38
3.4.2 Disfunción endotelial	38
3.5 Albuminuria y rigidez arterial	39
4 Mecanismos comunes implicados en la enfermedad renal y cardiovascular	40
4.1 Estrés oxidativo	40
4.1.1 Generación de especies reactivas de oxígeno	41
4.1.1.1 Sistemas enzimáticos implicados en la generación de EROs	41
NADPH oxidasa	41
NOX5	42
4.1.1.2 Otros sistemas enzimáticos productores de EROs	42
4.1.2 Sistemas de defensa antioxidante	42
4.1.2.1 Superóxido dismutasa	43
4.1.3 Contribución de las EROs al daño renal y a la albuminuria	43
4.1.3.1 Acción de las EROs sobre el endotelio de los vasos renales	44
4.1.3.2 Acción de las EROs sobre las proteínas de matriz extracelular	45
4.2 Remodelado de la matriz extracelular	46
4.2.1 Proteasas implicadas en el proceso de remodelado de la MEC	46
4.2.1.1 Metaloproteasas de matriz (MMPs)	46
Estructura de las MMPs	48
Regulación de MMPs	49
Metaloproteasa de matriz 2 o Gelatinasa A	50
Metaloproteasa de matriz 9 o Gelatinasa B	51
4.2.1.2 Otras proteasas de matriz extracelular	52
Adamalisin	52
Meprinas	52
Serín proteasas	52
Heparanasas y sulfatasas	52
4.2.2 Inhibidores endógenos de MMPs	53
4.2.2.1 Inhibidores tisulares de metaloproteasas de matriz	53
TIMP1	53

TIMP2	53
4.2.2.2 α 2 macroglobulina	54
4.2.3 Contribución de las MMPs en la patología renal	54
4.2.4 Papel de las MMPs en el remodelado arterial	55
4.3 Micropartículas	56
4.3.1 Formación de micropartículas	56
4.3.2 Papel fisiopatológico de las micropartículas	57
4.3.3 Micropartículas en la enfermedad renal	58
4.3.4 Micropartículas y MMPs	58
5 Tratamiento farmacológico antihipertensivo como estrategia terapéutica contra la enfermedad cardiovascular y renal	58
5.1 Fármacos antihipertensivos bloqueantes del SRA	59
5.1.1 Albuminuria resistente al bloqueo del SRA	60
5.2 Vitamina D como nueva estrategia terapéutica	62
5.2.1 Déficit de vitamina D	62
5.2.2 Déficit de vitamina D y enfermedad renal	62
5.2.3 Síntesis de vitamina D	63
5.2.3.1 Regulación de la síntesis de vitamina D	64
5.2.4 Mecanismo de acción	65
5.2.5 Suplemento con vitamina D	66
6 Ratas Munich Wistar Frömter como modelo experimental para el estudio de la enfermedad renal	67
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	73
MATERIAL Y MÉTODOS	
1 Modelos experimentales	77
1.1 Descripción de los modelos experimentales	77
1.2 Protocolo seguido en el tratamiento farmacológico con calcitriol en ratas MWF y Wistar	78
2 Estudio en pacientes	79
2.1 Características clínicas de los pacientes	79
2.2 Determinación del índice de masa corporal	79
2.3 Determinación de la función renal en los pacientes al finalizar el estudio	80
2.3.1 Determinación del índice de filtrado glomerular estimado	80

2.3.2	Determinación de la excreción urinaria de albúmina	80
3	Determinación de parámetros hemodinámicos en pacientes y modelos experimentales	81
3.1	Determinación de parámetros hemodinámicos en los modelos experimentales tras el tratamiento con calcitriol	81
3.2	Determinación de parámetros hemodinámicos en pacientes	82
3.1.1	Determinación de la presión arterial	82
3.1.2	Determinación de la velocidad de onda de pulso	82
4	Obtención de muestras en pacientes y en los modelos experimentales	83
4.1	Sacrificio y obtención de muestras en los distintos modelos experimentales	83
4.2	Obtención de plasma y determinaciones posteriores en pacientes	84
4.3	Determinación de la concentración de proteínas totales en plasma de pacientes y ratas y en homogenizado de riñón de rata	84
5	Estudios en aorta torácica aislada en los modelos experimentales	85
5.1	Estudios de función vascular	85
5.1.1	Determinación de la capacidad relajante dependiente de endotelio	86
5.1.2	Determinación de la capacidad relajante independiente de endotelio	86
5.1.3	Preparación de fármacos utilizados en los estudios de función vascular	86
5.2	Estudio de microscopía confocal de fluorescencia	86
5.2.1	Determinación de la biodisponibilidad de anión superóxido	86
6	Determinación de la concentración de marcadores de matriz extracelular	87
7	Estudio de las metaloproteasas de matriz extracelular	88
7.1	Determinación de la concentración de MMP2 y MMP9 mediante ELISA	88
7.2	Determinación de la concentración de MMP2 activa y de MMP9 activa mediante inmunoensayo	89
7.3	Determinación de la actividad gelatinasa de MMP2 y MMP9 mediante zimografía en gel de poliacrilamida	90
7.4	Estudio de la expresión de proteínas TIMP1, pro-MMP9, MMP9 y NOX5 mediante <i>Western Blot</i>	91
8	Estudio de parámetros de estrés oxidativo en modelos experimentales	

y en pacientes	93
8.1 Determinación de la actividad NADPH oxidasa en riñón	93
8.2 Determinación de la actividad SOD total en riñón	94
8.3 Determinación de la oxidación de proteínas plasmáticas	94
8.4 Determinación de la oxidación de proteínas plasmáticas por <i>Western Blot</i>	95
8.5 Determinación del TIMP1 oxidado mediante inmunoprecipitación	96
9 Estudio de la interacción proteica MMP9/TIMP1 utilizando la tecnología Alpha-LISA	97
9.1 Fundamento de la técnica	97
9.2 Protocolo y validación del ensayo	97
9.2.1 Conjugación de las microperlas aceptoras	97
9.2.2 Interacción de las proteínas recombinantes	98
9.3 Determinación de la interacción MMP9/TIMP1 en muestras de plasma de pacientes	99
10 Estudio de micropartículas contenidas en el plasma de paientes por citometría de flujo	101
10.1 Fundamento de la técnica	101
10.2 Determinación del contenido total de micropartículas	101
10.3 Determinación de la procedencia de las micropartículas	102
10.4 Aislamiento de micropartículas	103
11 Análisis estadístico	103

RESULTADOS

1 Caracterización de las ratas MWF como modelo experimental de desarrollo espontáneo de albuminuria	107
1.1 Caracterización del modelo animal	107
1.2 Determinación de la función vascular en aorta torácica	107
1.2.1 Determinación de la respuesta contráctil	107
1.2.2 Determinación de la respuesta vasodilatadora dependiente e independiente de endotelio	108
1.2.3 Determinación de la contribución de NO a la relajación dependiente de endotelio	108
1.2.4 Determinación de los prostanoïdes a la relajación dependiente de endotelio	109

1.3	Estudio de marcadores de estrés oxidativo y defensa antioxidante	110
1.3.1	Determinación de la presencia de $O_2^{\cdot -}$ en aorta torácica	110
1.3.2	Determinación de la actividad de NADPH oxidasa y SOD en riñón	111
1.4	Determinación de la actividad gelatinasa de las metaloproteasas de matriz MMPs	112
1.4.1	Determinación de la actividad gelatinasa de MMP2	112
1.4.2	Determinación de la actividad gelatinasa de MMP9	113
2	Relación entre la presencia de albuminuria, estrés oxidativo y remodelado de la matriz extracelular	115
2.1	Caracterización de los diferentes modelos experimentales	116
2.2	Determinación de la actividad de NADPH oxidasa y SOD en homogenizado de riñón	116
2.3	Determinación de la actividad gelatinasa de MMPs	117
2.3.1	Determinación de la actividad gelatinasa de MMP2	117
2.3.2	Determinación de la actividad gelatinasa de MMP9	118
3	Efectos del tratamiento con calcitriol sobre el modelo de rata espontáneamente albuminúrica MWF	119
3.1	Caracterización del modelo experimental tras el tratamiento	120
3.2	Determinaciones bioquímicas en plasma	120
3.3	Efecto del tratamiento con calcitriol sobre la función vascular en aorta	121
3.3.1	Efecto del tratamiento con calcitriol sobre la respuesta contráctil	121
3.3.2	Efecto del tratamiento con calcitriol sobre la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio	122
3.3.3	Efecto del tratamiento con calcitriol sobre la respuesta vasodilatadora independiente de endotelio	122
3.3.4	Efecto del tratamiento con calcitriol sobre la contribución del NO a la relajación dependiente de endotelio	123
3.3.5	Efecto del tratamiento con calcitriol sobre la contribución de los prostanoïdes a la relajación dependiente de endotelio	125
3.4	Efecto del tratamiento con calcitriol sobre la actividad gelatinasa de la MMP9	126
4	Marcadores de remodelado y de estrés oxidativo implicados en la albuminuria desarrollada bajo bloqueo crónico de SRA	128
4.1	Características clínicas de los pacientes	128

4.2 Estudio de la rigidez arterial	130
4.3 Determinación de la concentración plasmática de marcadores de remodelado de matriz extracelular	132
4.4 Determinación de la actividad de MMP2 y MMP9 en plasma	133
4.5 Determinación de la expresión de TIMP1	135
4.6 Estudio de la relajación de la actividad de MMP9 con los marcadores de daño renal y vascular observados en pacientes	136
4.7 Determinación de marcadores de daño oxidativo en pacientes	139
4.7.1 Determinación del grado de oxidación de las proteínas plasmáticas	139
4.7.2 Determinación de la oxidación de TIMP1	141
4.8 Estudio de la interacción entre MMP9 y su inhibidor endógeno TIMP1	143
4.8.1 Validación del ensayo de interacción MMP9/TIMP1 con proteínas recombinantes humanas	143
4.8.2 Determinación de la interacción de MMP9/TIMP1 en plasma de pacientes	143
4.9 Estudio de las micropartículas presentes en plasma de pacientes	144
4.9.1 Determinación del número total de micropartículas en plasma	145
4.9.2 Estudio de la procedencia celular de las micropartículas	145
4.9.3 Determinación del contenido proteico de las micropartículas aisladas de plasma de pacientes	146
4.9.3.1 Determinación del contenido en MMP9	146
4.9.3.2 Determinación del contenido en NOX5	147

DISCUSIÓN

1. La albuminuria está asociada con la disfunción endotelial y con un aumento del estrés oxidativo tanto vascular como renal	151
2. La albuminuria se asocia a un aumento de la actividad de MMP9	153
3. El aumento de la actividad de MMP9 se debe a una disminución de la capacidad inhibitoria de TIMP1 producida por el aumento del estrés oxidativo	156
4. Implicación del aumento de la actividad de MMP9 sobre el desarrollo de albuminuria resistente al bloqueo del SRA	157
5. Las micropartículas como fuente de MMP9 y NOX5	158
6. Efecto del tratamiento farmacológico sobre los marcadores estudiados	159
7. Tratamiento antioxidante como estrategia terapéutica	161

8. El tratamiento con calcitriol mejora la función vascular y corrige el aumento de actividad de MMP9	163
9. Conclusiones	166
CONCLUSIONES	169
CONCLUSIONS	173
BIBLIOGRAFÍA	177
ANEXO: Publicaciones derivadas de esta Tesis Doctoral	203

ÍNDICE DE FIGURAS	Páginas
Figura 1: Estructura de la pared arterial	24
Figura 2: Prevalencia de la albuminuria en la población sana, población general y población con hipertensión	27
Figura 3: Modelo explicativo de la estructura de una nefrona	30
Figura 4: Micrografía electrónica de la barrera de filtración glomerular	31
Figura 5: Modelo representativo de la estructura del endotelio glomerular fenestrado	32
Figura 6: Modelo representativo de la estructura de los podocitos glomerulares	35
Figura 7: Principales mecanismos implicados en la hipertensión y la albuminuria	40
Figura 8: Modelo representativo de la estructura de una gelatinasa	49
Figura 9: Activación mediante proteólisis o mediante oxidación de las MMPs	50
Figura 10: Esquema del SRA y sus principales inhibidores usados en clínica	59
Figura 11: Esquema explicativo de la síntesis y metabolismo de vitamina D en el organismo	64
Figura 12: Esquema de la obtención de la cepa de ratas consómicas MWF-6 ^{SHR} y MWF-8 ^{SHR}	68
Figura 13: Esquema del protocolo seguido para realizar el tratamiento con calcitriol o vehículo en las ratas MWF y Wistar	78
Figura 14: Esquema del sistema de inclusión de pacientes en el estudio	81
Figura 15: Esquema representativo de la obtención de parámetros hemodinámicos en la rata anestesiada	82
Figura 16: Esquema representativo del inmunoensayo para la determinación de actividad de MMPs	89
Figura 17: Fundamento del ensayo de determinación de la actividad de la superóxido dismutasa	94
Figura 18: Esquema de la reacción entre el grupo carbonilo y el compuesto DNPH	94
Figura 19: Esquema explicativo del protocolo de la técnica Alpha-LISA	100
Figura 20: Respuesta contráctil a KCl y a NA en aorta de animales WKY y MWF	108
Figura 21: Relajación a ACh y NPS en los animales WKY y MWF	108
Figura 22: Relajación a ACh en presencia y ausencia de L-NAME en los animales	

WKY y MWF	109
Figura 23: Relajación a ACh en presencia y ausencia de indometacina en los animales WKY y MWF	110
Figura 24: Producción de $O_2^{\cdot -}$ en anillos de aorta de animales WKY y MWF	111
Figura 25: Actividad de NADPH oxidasa y SOD en homogenizado de riñón de animales WKY y MWF	112
Figura 26: Actividad gelatinasa de MMP2 en plasma y riñón de ratas WKY y MWF	113
Figura 27: Actividad gelatinasa de MMP9 en plasma de ratas WKY y MWF	114
Figura 28: Actividad gelatinasa de MMP9 en riñón de ratas WKY y MWF	115
Figura 29: Actividad de NADPH oxidasa y SOD en homogenizado de riñón de ratas MWF, MWF-8 ^{SHR} y SHR	117
Figura 30: Actividad gelatinasa de MMP2 en plasma y riñón de MWF, MWF-8 ^{SHR} y SHR	118
Figura 31: Actividad gelatinasa de MMP9 en plasma y riñón de MWF, MWF-8 ^{SHR} y SHR	119
Figura 32: Respuesta contráctil a KCl tras el tratamiento con calcitriol	121
Figura 33: Respuesta contráctil a NA tras el tratamiento con calcitriol	121
Figura 34: Relajación a Ach tras el tratamiento con calcitriol	122
Figura 35: Relajación a NPS tras el tratamiento con calcitriol	123
Figura 36: Relajación a ACh en presencia y ausencia de L-NAME tras el tratamiento con calcitriol	123
Figura 37: Relajación a ACh en presencia y ausencia de indometacina tras el tratamiento con calcitriol	125
Figura 38: Estudio de la actividad gelatinasa MMP9 en plasma y riñón tras el tratamiento con calcitriol	127
Figura 39: Correlación entre la concentración de 25-hidroxicolecalciferol y el logaritmo del cociente albúmina/creatinina	130
Figura 40: Velocidad de onda de pulso (a) y correlación entre la VOP y la albuminuria	131
Figura 41: Correlación entre la edad de los pacientes y la VOP	132
Figura 42: Actividad gelatinasa de MMP2 y MMP9 en el plasma de los pacientes	134
Figura 43: Concentración de MMP2 (a) y MMP9 (b) activas en plasma de pacientes	135

Figura 44: Expresión plasmática de TIMP1	136
Figura 45: Correlación entre la albuminuria de los pacientes y la actividad de MMP9 (a) y la concentración de MMP9 activa (b)	137
Figura 46: Correlación entre el índice de filtrado glomerular y la concentración de MMP9 activa	137
Figura 47: Correlación entre la VOP y la concentración de MMP9 activa	138
Figura 48: Correlación entre la concentración de colágeno tipo IV circulante y la actividad de MMP9	138
Figura 49: Efecto del tipo de bloqueo de SRA sobre la actividad plasmática de MMP9 en pacientes	139
Figura 50: Determinación de la concentración de proteínas plasmáticas carboniladas	140
Figura 51: Correlación entre la concentración de 25-hidroxicolecalciferol y los valores de concentración de carbonilos (a) y correlación entre la actividad plasmática de MMP9 y la concentración de carbonilos en plasma	140
Figura 52: Determinación de la carbonilación de proteínas plasmáticas mediante <i>Western Blot</i>	141
Figura 53: Determinación de la oxidación de TIMP1 mediante inmunoprecipitación	142
Figura 54: Señal de interacción de MMP9 y TIMP1 recombinantes humanas a concentraciones crecientes mediante la tecnología AlphaLISA	143
Figura 55: Determinación de la interacción entre MMP9 y TIMP1 en plasma de pacientes mediante la tecnología AlphaLISA	144
Figura 56: Determinación del número total de micropartículas en plasma mediante citometría de flujo	145
Figura 57: Correlación entre el valor de VOP y el número total de MPs en plasma de pacientes	145
Figura 58: Número de micropartículas derivadas de células endoteliales y monocitos determinadas por citometría de flujo en plasma de pacientes	146
Figura 59: Expresión de pro-MMP9 (b) y MMP9 (c) mediante <i>Western Blot</i> en micropartículas extraídas de plasma de pacientes	147
Figura 60: Expresión de NOX5 mediante <i>Western Blot</i> en las MPs extraídas de plasma de pacientes	148
Figura 61: Modelo ilustrativo de la propuesta sobre las consecuencias patológicas de un aumento de la actividad de MMP9 en la BFG	158

ÍNDICE DE TABLAS

Páginas

Tabla 1: Clasificación en grados de la enfermedad renal crónica	19
Tabla 2: Factores de riesgo de enfermedad crónica renal	20
Tabla 3: Clasificación de la enfermedad renal crónica según la guía KDIGO	21
Tabla 4: Definición y clasificación de los niveles de presión sanguínea	23
Tabla 5: Clasificación de las MMPs	46
Tabla 6: Esquema seguido para realizar el ensayo de determinación de la actividad de NADPH oxidasa en riñón	93
Tabla 7: Titulación de las proteínas MMP9/TIMP1 recombinantes para la puesta a punto del ensayo de AlphaLISA	98
Tabla 8: Caracterización de los modelos animales WKY y MWF	107
Tabla 9: Valores de Emax y ΔABC de la relajación inducida por ACh en presencia de L-NAME en animales WKY y MWF	109
Tabla 10: Caracterización de los modelos animales MWF, MWF-8 ^{SHR} y SHR	116
Tabla 11: Características de los animales Wistar y MWF tras el tratamiento con calcitriol	120
Tabla 12: Determinaciones bioquímicas tras el tratamiento con calcitriol	120
Tabla 13: Valores de Emax y ΔABC de la relajación inducida por ACh en presencia de L-NAME tras el tratamiento con calcitriol	124
Tabla 14: Valores de Emax y ΔABC de la relajación inducida por ACh en presencia de indometacina tras el tratamiento con calcitriol	126
Tabla 15: Datos demográficos de los pacientes incluidos en el estudio	129
Tabla 16: Porcentaje de pacientes tratados con estatinas, iECAS o ARA II en cada grupo	130
Tabla 17: Determinaciones bioquímicas de marcadores de remodelado de MEC en el plasma de los pacientes	132

ABREVIATURAS

ΔABC	Incremento del área bajo la curva
¹O₂	Oxígeno singlete
AAT	Alpha-1 antitripsina
ABC	Área bajo la curva
ACh	Acetilcolina
ACCORD	Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes
ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase
ADAMT	A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin motifs
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AlphaLISA	Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay
Ang II	Angiotensina II
AP-1	Activador de la proteína 1
ARA II	Antagonista del receptor de angiotensina II
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
AT1	Receptor de angiotensina II tipo 1
ATP	Adenosín trifosfato
BENEDICT	BERgamo NEphrologic Diabetes Complications Trial
BFG	Barrera de filtrado glomerular
CE	Célula endotelial
CKD-EPI	Chronic kidney disease epidemiology collaboration
CMLV	Células de músculo liso vascular
COX	Ciclooxigenasa
CV	Cardiovasculares
Cu/Zn SOD	Isoforma citosólica de la superóxido dismutasa
DAPI	4',6'-diamino-2-fenilidol
DBP	Proteína de unión a vitamina D
DHE	Dihidroetidio
DNPH	Dinitrofenilhidracina
ECA	Enzima convertidora de angiotensina
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

EMax	Respuesta máxima
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
EROs	Especies reactivas de oxígeno
E.S.	Error estándar de la media
ESC	European society of cardiology
ESH	European society of hypertension
ET-1	Endotelina 1
FC	Frecuencia cardíaca
FGF-23	Factor de crecimiento de fibroblastos-23
GSH	Glutation reducido
GSSG	Glutation oxidado
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HDL	Lipoproteína de alta densidad
hs-CRP	High sensitivity C reactive protein
HOT	Hypertension Optimal Treatment
IECA	Inhibidor de la Enzima Convertidora de Angiotensina
IFGe	Índice de filtrado glomerular estimado
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de masa corporal
IMPROVE	Managed Pharmaceutical Care on Resource Utilization and Outcomes in Veterans Affairs Medical Centers
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
KDIGO	Kidney disease improving global outcomes
KH	Krebs Henseleit
LDL	Lipoproteína de baja densidad
LIFE	Losartan Intervention For Endpoint reduction
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginina-metil-éster
MDA	Malón dialdehído
MEC	Matriz extracelular
MIDAS	Metalloproteinase Inhibition with Low-Dose Doxycycline to Prevent Acute Coronary Syndromes
MMP	Metaloproteinasa de matriz
Mn SOD	Isoforma mitocondrial de la superóxido dismutasa
MWF	Munich Wistar Frömter

NA	noradrenalina
NADH	Dinucleótido reducido de nicotinamida y adenina
NADPH	Dinucleótido fosfato reducido de nicotinamida y adenina
NAHNES	National Health and Nutrition Examination Survey
NF-κB	Factor de nuclear κB
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
NOX	NADPH oxidasa
NPS	Nitroprusiato sódico
O₂^{•-}	Anión superóxido
OH[•]	Radical hidroxilo
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONOO^{•-}	Radicales peroxinitrito
ONOOH	Ácido peroxinitroso
ONTARGET	ONgoing Telmisartan Alone and in combination with Ramipril Global Endpoint Trial
PAD	Presión arterial diastólica
PAS	Presión arterial sistólica
PBS	Tampón fosfato salino
PFA	Paraformaldehído
PICP	Propéptido C-terminal de procolágeno tipo I
PP	Presión de pulso
PREVEND	Prevention of RENal and Vascular ENd-stage Disease
PTH	Hormona paratiroidea
QTL	Locus de carácter cuantitativo
ROADMAP	Randomized Olmesartan and Diabetes Microalbuminuria Prevention
SDS	Dodecil sulfato sódico
SHR	Rata espontáneamente hipertensa
SOD	Superóxido dismutasa
SRA	Sistema renina angiotensina
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
STAT	Proteína transductora de la señal y activadora de la transcripción

TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
TIMP	Inhibidor tisular de metaloproteinasa de matriz
TINAGL1	Antígeno relacionado con nefritis tubulointersticial tipo 1
TNFα	Factor de necrosis tubular α
TRANSCEND	Telmisartan Randomized Assessment Study in ACE Intolerant Subjects with Cardiovascular Disease
VDR	Receptor de vitamina D
VOP	Velocidad de onda de pulso
WKY	Wistar kyoto

RESUMEN

MECANISMOS MOLECULARES ASOCIADOS AL ESCAPE DE ALBUMINURIA EN PACIENTES CON SUPRESIÓN CRÓNICA DEL SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA: UN ABORDAJE TRASLACIONAL

INTRODUCCIÓN

La enfermedad cardiovascular (CV) y la enfermedad renal están ampliamente relacionadas, de tal forma, que muchos de los factores de riesgo CV lo son también renales y viceversa. En este contexto, se propuso el término *continuo cardiorrenal*, mediante el cual se reflejan los distintos estadios tanto de enfermedad renal como de enfermedad CV que normalmente están interrelacionados (Ruilope y cols., 2012). Uno de los principales factores de riesgo de ambas enfermedades es la albuminuria (Cerasola y cols., 2010), que se produce como resultado de una pérdida de la capacidad de filtración selectiva de la barrera de filtración glomerular (BFG). Son muchos los estudios que proponen a la albuminuria como marcador de disfunción endotelial en el riñón que refleja, a su vez, un daño vascular sistémico (Abdelhafiz y cols., 2011). Se ha descrito, que la disfunción endotelial está relacionada con un aumento de estrés oxidativo (Singh y cols., 2013) y éste a su vez, con alteraciones en la actividad de proteínas reguladoras del remodelado de la matriz extracelular (MEC) como son las metaloproteasas de matriz extracelular (MMPs), concretamente MMP2 y MMP9 (Rajagopalan y cols., 1996). En este sentido, se ha descrito que el aumento de la expresión y de la actividad de estas proteasas está relacionado con la aparición de albuminuria en estudios realizados tanto en animales (McKittick y cols., 2011) como en pacientes (Peeters y cols., 2015). En este contexto, se han propuesto como marcadores de alteraciones glomerulares y tubulares en patologías como la insuficiencia renal diabética (Altemtam y cols., 2012).

Por otro lado, se ha descrito que fármacos como los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (iECAs) y los antagonistas del receptor de angiotensina II (ARA II), además de disminuir los valores de presión arterial, son capaces de disminuir la albuminuria (ESH,ESC, 2013; Rojas-Rivera y cols., 2012). Sin embargo, recientemente se ha publicado que pacientes hipertensos que se encuentran bajo este tratamiento desarrollan albuminuria resistente al bloqueo del sistema renina angiotensina (SRA), también denominado escape de albuminuria, pese a presentar un buen control de la presión arterial (Cerezo y cols., 2012).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En este contexto, las hipótesis planteadas en este estudio son: i) la albuminuria podría estar relacionada con alteraciones en la función vascular y en la actividad de proteasas de matriz extracelular como son las gelatinasas MMP2 y MMP9. Estas alteraciones a su vez, podrían deberse a un desajuste en el equilibrio oxidativo, ii) el desajuste en la actividad de las

gelatinasas MMP2 y MMP9, así como en el equilibrio oxidativo podrían tener una implicación traslacional en estados patológicos que aparecen en la práctica clínica como la albuminuria resistente al bloqueo del SRA, iii) la suplementación con calcitriol como estrategia terapéutica para corregir el desajuste en el equilibrio oxidativo podría controlar la aparición de la albuminuria y las alteraciones asociadas a la misma.

Los objetivos propuestos fueron: i) caracterizar un modelo genético de desarrollo espontáneo de albuminuria, estudiando la función vascular y marcadores de daño renal, como son el estrés oxidativo y la actividad de las MMPs, ii) estudiar si los marcadores de daño oxidativo y de remodelado son exclusivamente dependientes del desarrollo de albuminuria y no dependen de la presencia de hipertensión, iii) determinar si los marcadores alterados en el modelo genético de albuminuria lo están también en pacientes hipertensos controlados que desarrollan albuminuria resistente al bloqueo del SRA, iv) caracterizar los mecanismos implicados en la alteración de los marcadores de remodelado de la MEC en estos pacientes, v) determinar si un tratamiento crónico con calcitriol revierte la albuminuria en el modelo experimental y sus marcadores de daño asociados, como son la disfunción endotelial, el aumento de estrés oxidativo y el aumento en la actividad de las MMPs.

RESULTADOS

Las ratas MWF (Munich Wistar Frömter), son un modelo animal que desarrolla espontáneamente albuminuria a partir de las 6 semanas de edad, pero que a las 12 semanas, la edad a la que se utilizaron para realizar este estudio, no presentan hipertensión. Las ratas MWF mostraron una disminución significativa de la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio en comparación con los animales controles, debido en parte al efecto de prostanoïdes vasoconstrictores sobre la relajación vascular y a una disminución de la biodisponibilidad de óxido nítrico (NO), probablemente producida por un aumento del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). De forma paralela, en riñón se observó un aumento de la actividad de NADPH oxidasa y una disminución de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD). Además, en estos animales, la actividad de MMP9 estaba aumentada a nivel plasmático y a nivel renal.

Para confirmar si este aumento tanto del estrés oxidativo, como de la actividad de MMP9 se debía exclusivamente a la presencia de la albuminuria, se utilizaron las ratas consómicas MWF-8^{SHR}. Esta cepa se obtiene de sustituir el cromosoma 8 de las ratas MWF, por el mismo cromosoma de las ratas SHR que son un modelo de hipertensión espontánea, que a las 12 semanas de edad no presenta albuminuria. La elección de este cromosoma se basa en trabajos anteriores en los que se ha descrito que está implicado en la aparición de la albuminuria en

este modelo animal (Van Es y cols., 2011). En estos animales se observó que al desaparecer la albuminuria se normalizaban los niveles de actividad de NADPH oxidasa y SOD renales, al igual que la actividad de MMP9 tanto en plasma como en riñón.

En las ratas MWF, además se observó una disminución significativa de la concentración plasmática de 25-hidroxicolecalciferol en comparación con los controles Wistar, que se normalizó en las ratas MWF-8^{SHR}. Debido a los efectos beneficiosos de la suplementación con vitamina D observados sobre el SRA, el estrés oxidativo, el control de la actividad de MMPs (Timms y cols., 2002) y la consiguiente mejora de la función renal (Lucisano y cols., 2013) se planteó el siguiente objetivo: estudiar si un tratamiento crónico con 0,25 µg de calcitriol/Kg/día durante 7 semanas a las ratas MWF, era capaz de disminuir la albuminuria y los marcadores tanto de daño vascular como de daño renal asociados a ella en este modelo. Los resultados de este estudio mostraron un aumento significativo de la relajación dependiente de endotelio en las ratas MWF tratadas con calcitriol en comparación con los controles, que se acompañó por un aumento en la biodisponibilidad de NO y la eliminación del efecto de los prostanoides vasoconstrictores. Además, el tratamiento con calcitriol normalizó la actividad de MMP9 tanto a nivel plasmático como a nivel renal en las ratas MWF. Todo esto confirmó el efecto beneficioso de una suplementación con calcitriol sobre la función vascular y los marcadores de daño renal en la albuminuria.

Como siguiente objetivo se estudió la relevancia clínica de la actividad de las MMPs como posibles marcadores de daño vascular y renal asociados al desarrollo de albuminuria resistente al bloqueo del SRA en pacientes hipertensos controlados. Para llevar a cabo este estudio se dividió a los pacientes en función de sus niveles de excreción urinaria de albúmina, expresada como el coeficiente albúmina/creatinina, en pacientes normoalbuminúricos (aquellos que presentaban valores <20mg/g para hombres y <30 mg/g para mujeres) y pacientes con albuminuria resistente. Este último grupo se dividió a su vez en dos, pacientes con albuminuria resistente moderada (aquellos que presentaron valores >20 mg/g y ≤200mg/g para hombres y de >30 mg/g y ≤300 mg/g en mujeres) y pacientes con albuminuria resistente severa (aquellos que presentaron valores >200 mg/g en hombres y >300 mg/g en mujeres). El porcentaje de pacientes tratados con iECAs o con ARA II dentro de cada grupo fue similar, lo cual indica que el tratamiento antihipertensivo no afectó al desarrollo de albuminuria. Además, más del 70% de estos pacientes estaban tratados con estatinas como fármacos hipolipemiantes, llegando a alcanzar el 88% en los pacientes con albuminuria resistente severa.

Los pacientes con albuminuria resistente presentaron un aumento significativo de la velocidad de onda de pulso (VOP) determinada entre la arteria carótida y la femoral como marcador de rigidez arterial, en comparación con los pacientes normoalbuminúricos. El valor de VOP que presentaron estos pacientes fue de 9,45 m/s, considerándose 10 m/s el valor a partir del cual aparece rigidez arterial (ESH/ESC, 2013). Este resultado se puede deber al aumento de la degradación de la elastina de las arterias, sin embargo el estudio de la concentración de desmosina en plasma, como metabolito de degradación de la misma, no mostró diferencias significativas entre los pacientes. Tampoco se observaron diferencias en la concentración plasmática de PICP como marcador de fibrosis. Sin embargo, sí se observó un aumento del colágeno tipo IV en plasma, que es un marcador de la degradación en tejido de esta molécula. A pesar de este resultado no se observaron diferencias significativas en la concentración plasmática de MMP2 ni de MMP9, que son las principales enzimas encargadas de la degradación de colágeno tipo IV (colágeno mayoritario en la MEC glomerular). Por lo que se realizó un estudio de la actividad de estas proteasas mediante zimografía en gel y mediante un inmunoensayo que permite la determinación de la concentración de las MMPs activas. Estos estudios mostraron un aumento tanto de la actividad como de la concentración de la MMP9 activa en el plasma de los pacientes con albuminuria resistente, que era incluso mayor en los pacientes con albuminuria resistente severa en comparación con los pacientes con albuminuria resistente moderada. Sin embargo, al separar la actividad de la MMP9 en función del tipo de bloqueo del SRA con el que se trató a los pacientes no se observaron diferencias significativas en la misma, lo que demuestra que el tratamiento pautado no influyó en la actividad de esta proteasa. Por otro lado, el aumento de la concentración de MMP9 activa, correlacionó de forma positiva con el grado de albuminuria de los pacientes y con la VOP y de forma negativa con el IFGe. Debido a los resultados obtenidos, se profundizó en el estudio del mecanismo implicado en el aumento de la actividad de esta proteasa. Como su actividad está estrechamente regulada por su inhibidor endógeno TIMP1, se realizó un estudio de la expresión de esta proteína por *Western Blot*, que no mostró diferencias significativas.

Por otro lado, se ha descrito que el estrés oxidativo puede favorecer un aumento en la actividad de las MMPs (Rajagopalan y cols., 1996), por lo que se determinó la concentración de los carbonilos plasmáticos como marcadores de estrés oxidativo y se observó un aumento de la misma en los pacientes con albuminuria resistente, que además correlacionó positiva y significativamente con la actividad plasmática de MMP9. En este sentido, se ha descrito que un aumento de la oxidación de los TIMPs puede hacer que pierdan su capacidad de interactuar con las MMPs y por lo tanto, perder su capacidad de inhibición (Wang y cols., 2007). Dadas

estas evidencias, se determinó mediante inmunoprecipitación la oxidación de TIMP1 y se observó un aumento de la misma en los pacientes con albuminuria resistente. En este contexto, se desarrolló un ensayo basado en la tecnología AlphaLISA que permite determinar la interacción entre estas dos proteínas. Previamente, se comprobó la idoneidad de esta técnica para el estudio de esta interacción en concreto mediante su puesta a punto con proteínas MMP9 y TIMP1 recombinantes humanas. Se observó una disminución de la interacción MMP9/TIMP1 en los pacientes con albuminuria resistente. Lo cual sugiere, que el aumento del estrés oxidativo en los pacientes con albuminuria resistente produce la oxidación de TIMP1, que se traduce en la pérdida de su capacidad inhibitoria y por lo tanto, en un aumento de la actividad de MMP9. Por otro lado, se ha descrito que estímulos de daño como el estrés oxidativo también pueden producir la activación de distintos tipos celulares que como consecuencia producen la liberación micropartículas al medio extracelular, de tal manera, que las micropartículas se consideran marcadores de daño celular (Berezin y cols., 2015). El estudio del número total de micropartículas, así como el número de micropartículas derivadas de células endoteliales y de monocitos no mostró diferencias significativas entre los pacientes, sin embargo se observó una correlación positiva entre el número total de micropartículas y la VOP. Posteriormente, se estudió el contenido proteico de las micropartículas, y se observó la expresión de MMP9 tanto en su forma activa como de zimógeno, y de NOX5, lo cual indica que las micropartículas son una fuente de estas proteínas.

CONCLUSIONES

En conclusión, éste es el primer estudio que demuestra, a través del uso de modelos experimentales y de pacientes, que la activación de MMP9 es exclusivamente dependiente de la presencia de albuminuria y no de otras comorbilidades. En este sentido, los resultados obtenidos indican que un buen bloqueo del SRA, no garantiza el control de la actividad de MMP9 en los pacientes que se encuentran en un estadio temprano de enfermedad crónica renal. Este aumento de la actividad de MMP9 podría producir un aumento de la degradación de colágeno tipo IV, que es el principal componente de la MEC que forma parte del glomérulo, lo cual se puede traducir en una desestructuración de la misma que favorecería la aparición de albuminuria. Por otro lado, se ha observado el efecto beneficioso de una suplementación con calcitriol sobre la función vascular en las ratas albuminúricas MWF, al igual que una disminución de la actividad de MMP9 tras este tratamiento. En este sentido, el uso de una terapia coadyuvante como la suplementación con vitamina D, podría mejorar los daños asociados a la albuminuria en pacientes en los que la terapia antihipertensiva habitual no es capaz de controlarla.

ABSTRACT

MOLECULAR MECHANISMS ASSOCIATED TO ALBUMINURIA ESCAPE IN PATIENTS UNDER CHRONIC RAS BLOCKADE: A TRANSLATIONAL APPROACH

INTRODUCTION

Cardiovascular and renal diseases are highly associated, so that, many cardiovascular risk factors are also renal risk factors and viceversa. The concept of cardiorenal continuum reflects the different stages of cardiovascular and renal disease, which are often interlinked (Ruilope y cols., 2012). One of the main common cardiovascular and renal risk factor is albuminuria (Cerasola et al., 2010). It is the result of the glomerular filtration barrier permselectivity loss. Albuminuria is proposed as a marker of endothelial dysfunction in the kidney reflecting a systemic vascular damage (Abdelhafiz et al., 2011). Endothelial dysfunction is strongly related to an increase of oxidative stress (Singh et al., 2013), which can regulate extracellular matrix remodelling by the modulation of matrix metalloproteinases (MMP)2 and MMP9 activity, (Rajagopalan et al., 1996). In this context, the increase in the expression and the activity of this proteases is highly related with albuminuria in both animal (McKittick y cols., 2011) and patient studies (Altemtam y cols., 2012; Peeters y cols., 2015) and they have been proposed as markers of glomerular and tubular alterations in several renal pathologies.

Blockers of the renin-angiotensin system (RAS), such as angiotensin converting enzyme inhibitors (ACEi) or angiotensin receptor blockers (ARB), are able to decrease albuminuria apart from lowering blood pressure levels (ESH,ESC, 2013; Rojas-Rivera y cols., 2012). However, some hypertensive patients treated with RAS blockers develop albuminuria despite good blood pressure control (Cerezo et al, 2012). This albuminuria developed under RAS blockade was named as resistant albuminuria or albuminuria escape.

AIM AND OBJECTIVES

In this context, our hypothesis was that albuminuria may be associated with alterations in vascular function and MMP2 / MMP9 activity. These alterations may be due to an imbalance in the oxidative status. Supplementation with calcitriol as a therapeutic strategy to normalize the oxidative status may control albuminuria and its associated alterations. Moreover, alterations in MMP2 / MMP9 activity, as well as in the oxidative status, may have a traslational impact in resistant albuminuria.

Our objectives were: i) to characterize an inbred genetic model that develops albuminuria, to study vascular function and renal damage markers such as the oxidative stress and MMP2 / MMP9 activity, ii) to study if oxidative damage and remodeling markers are exclusively

dependent on albuminuria development and not on hypertension, iii) to perform a traslational study in resistant albuminuric patients under RAS suppression to study the markers that are modified in the animal model, iv) to characterize the underlying mechanisms associated to the alteration of matrix remodeling markers in these patients, and v) to study if a chronic treatment with calcitriol can control albuminuria development, as well as it associated damage markers (endothelial dysfunction, the increase in the oxidative stress and MMP2 / MMP9 activity).

RESULTS

MWF rats develop albuminuria at the age of 6 weeks, but exhibit a normal blood pressure, also at the age of 12 weeks, which is the age chosen for the present study. MWF rats showed a significant decrease in endothelial relaxation compared with control animals, mainly due to a decrease in NO and to an increase of superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) bioavailability. In agreement, we observed an increase of NADPH oxidase and a decrease of SOD activity in MWF kidney. MMP9 activity was significantly increased in both plasma and kidney suggesting that plasma MMP9 activity might be a good marker of renal damage. To confirm if the increase of oxidative stress and MMP9 activity is related to the presence of albuminuria, we used the consomic strain MWF-8^{SHR} in which chromosome 8, which was demonstrated to be linked to albuminuria development, was replaced by the respective SHR (spontaneously hypertensive rat) chromosome. NADPH oxidase and SOD activities were restored, as well as MMP9 activity in both plasma and kidney of MWF-8^{SHR}.

MWF rats showed a significant decrease in plasma levels of 25-hydroxycholecalciferol compared with WKY animals, whereas 25-hydroxycholecalciferol levels in MWF-8^{SHR} were similar to control animals. Due to the beneficial effects of vitamin D supplementation on RAS, oxidative stress, and MMPs activity (Timms et al, 2002), as well as on the improvement of renal function (Lucisano et al, 2013), the next objective of this study was to assess the effect of a chronic supplementation with calcitriol (25µg calcitriol/Kg/day) for 7 weeks, on albuminuria and the markers previously studied. The results showed a significant increase of endothelial dependent relaxation in MWF rats treated with calcitriol compared with their controls. This improvement was mainly due to the increase of the NO bioavailability, whereas those effects were not observed in MWF rats treated with vehicle. Moreover, the treatment with calcitriol showed a significant reduction of MMP9 activity in both plasma and kidney. All those results confirm the beneficial effect of the supplementation with calcitriol on the vascular function and the renal damage markers associated with albuminuria.

The next objective was to study MMPs activity as a marker of vascular and renal damage associated with resistant albuminuria in hypertensive patients treated with RAS blockers. Patients were divided according to their urinary albumin excretion in normoalbuminuric patients (albuminuria levels <20 mg/g for men and <30 mg/g for women) and patients with resistant albuminuria, which were subdivided in patients with moderate resistant albuminuria (albuminuria levels >20 mg/g and ≤ 200 mg/g for men, and >30 mg/g and ≤ 300 mg/g for women) and patients with severe resistant albuminuria (albuminuria levels >200 mg/g for men, and >300 mg/g for women). The percentage of patients treated with ACEi or ARBs were similar for all the groups thus demonstrating that the treatment has no influence on the development of albuminuria. Moreover, more than the 70% of the patients were treated with statins to control their lipid profile, reaching up the 80% in the severe resistant albuminuria group.

Patients with resistant albuminuria also show a significant increase in the pulse wave velocity (PWV) determined between carotid and femoral arteries compared with the normoalbuminuric group. The mean value for the resistant albuminuric group of patients was 9.45m/s, being the lower value that is considered as arterial stiffness of 10 m/s. This increase of the PWV may be due to the increase of the degradation of the elastin contained in the arterial wall, although the determination of plasma desmine as a byproduct of elastin degradation showed no differences between the groups.

Plasma carboxyterminal propeptide of procollagen type I (PICP) determination, as a marker of fibrosis, showed no differences between the groups. However, an increase of type IV collagen, as a marker of tissue collagen degradation, was observed in resistant albuminuric patients. Despite of the last result, we observed no significant differences in MMP2 or MMP9 plasma concentration. Because of this apparent contradiction in these results, we analyzed the activity of MMP2 and MMP9 by gelatin zymography and the concentration of the active MMPs by an immunoassay. We observed an increase in MMP9 activity, as well as an increase in the active MMP9 concentration in patients with resistant albuminuria compared with normoalbuminuric patients. This increase was also higher in patients with severe resistant albuminuria compared with those with moderate resistant albuminuria. Since MMP9 activity is tightly regulated by its endogenous inhibitor TIMP1, TIMP1 expression was assessed by Western Blot. However, no significant difference was observed between groups. The increase in active MMP9 concentration showed a positive correlation with the albuminuria level and with the PWV, whereas a negative correlation was established with the estimated glomerular

filtration rate. Moreover, no differences in MMP9 activity was observed between patients treated with ACEi or ARBs.

It is well known that an increase in oxidative stress can increase the activation of MMPs. According with this, we observed an increase in the plasma carbonyl concentration, as a marker of protein oxidation, in resistant albuminuric patients. Moreover, we observed a positive correlation between MMP9 activity and plasma carbonyl concentration. One of the mechanisms underlying the increase of MMPs activity during oxidative stress is the loss of TIMPs' inhibition ability due to its oxidation. In fact, patients with resistant albuminuria had an increased level of oxidized TIMP1 compared with the normoalbuminuric group.

To confirm that the increase of oxidized TIMP1 exhibited a decreased interaction with MMP9, and, consequently, an increase in MMP9 activity, we developed a new assay based on AlphaLISA technology, by which we can study the interaction between this two proteins. To assess if this assay was suitable to measure this interaction, we optimized the technique using TIMP1 and MMP9 human recombinant proteins. We observed a decrease of MMP9/TIMP1 interaction in patients with resistant albuminuria compared with normoalbuminuric patients. This result suggests that the increase of the oxidative stress in resistant albuminuric patients produce the oxidation of TIMP1, the loss of its inhibitory ability, and an increase in MMP9 activity.

The increase in oxidative stress may activate endothelial cells as well as immune cells. As a consequence of this activation, cells release microparticles to the extracellular environment which are considered as markers cellular damage. No differences were observed neither in the total number of microparticles nor in the number of microparticles from endothelial or immune cells. However, a positive correlation was found between the PWV and total plasma microparticles. Moreover, plasma microparticles expressed pro-MMP9, active MMP9 and NOX5 expression, although no differences were observed between patient groups. We suggest that plasma microparticles are a source of these proteins.

CONCLUSIONS

In conclusion, the use of experimental models and patients provides the first demonstration that MMP9 activation is exclusively dependent on the presence of albuminuria itself, independent of hypertension. Thus, the resistant albuminuria developed under RAS blockade, with BP and lipids under control, is strongly associated with an increase in MMP9 activity despite equal protein levels of this protease. Mechanistically, high MMP9 activity associated with resistant albuminuria is due to reduced MMP9/TIMP1 interactions and

increased levels of oxidized TIMP1, leading to activation of inducible MMP9. The increase in MMP9 activity can increase the degradation of type IV collagen, the most abundant component of the glomerular MEC. This can lead to the loss of ECM structure and the development of albuminuria. Therefore, an apparently adequate chronic RAS blockade does not guarantee good control of MMP9 activity in patients at an early stage of CKD. In this sense, we have observed the beneficial effect of a supplementation with calcitriol on vascular function and MMP9 activity in MWF rats.

INTRODUCCIÓN

1 ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR Y RENAL

1.1 ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

Las enfermedades cardiovasculares (CV) se definen como un grupo de enfermedades relativas al corazón y a los vasos sanguíneos que incluyen cardiopatía coronaria, enfermedad cerebrovascular, arteriopatía periférica, cardiopatía reumática, cardiopatía congénita, embolia pulmonar y trombosis venosa profunda (OMS, 2015). Según la organización mundial de la salud (OMS), las enfermedades CV son la primera causa de muerte a nivel global, provocando cada año el fallecimiento de 17 millones de personas. Se estima, que para 2030, sean la causa de casi el 24% de las defunciones mundiales. En Europa, las enfermedades CV son la causa de más de la mitad de las muertes, y en España, son la principal causa de muerte, llegando a provocar actualmente el 31% de las defunciones (OMS, 2013).

1.2 ENFERMEDAD RENAL

La insuficiencia renal crónica se define según las guías internacionales del consorcio KDIGO (*Kidney Disease: Improving Global Outcomes*), como la presencia de alteraciones en la estructura o la función renal durante al menos tres meses con implicaciones para la salud (KDIGO, 2012). Su diagnóstico clínico se basa en la determinación de dos factores principalmente, el índice de filtrado glomerular estimado (IFGe) como indicador de la función renal y la aparición de albúmina en orina (albuminuria) como marcador de daño renal (Ruilopec, 2002). Según estos dos parámetros las guías KDIGO han clasificado la insuficiencia renal crónica en función de su gravedad, en distintos grados, como se muestra en la siguiente tabla.

Tabla 1. Clasificación en grados de la enfermedad renal crónica. Modificado de Gorostidi y cols., 2014 y Ruilope y cols., 2011. Cociente A/C, albúmina/creatinina

CATEGORÍAS DEL FILTRADO GLOMERULAR			
Categoría	FG (mL/min/1,73 m²)	Descripción	
G1	≥ 90	Normal o elevado	
G2	60-89	Ligeramente disminuido	
G3a	45-59	Ligera a moderadamente disminuido	
G3b	30-44	Moderada a gravemente disminuido	
G4	15-29	Gravemente disminuido	
G5	<15	Insuficiencia renal	
CATEGORÍAS DE ALBUMINURIA			
Categoría	Cociente A/C (mg/g)		Descripción
	Hombres	Mujeres	
A1	<15	<10	Normal
	10 - <20	15 - <30	Ligeramente alta
A2	20 - 200	30 - 300	Moderadamente elevada
A3	>200	>300	Severamente elevada

1.3 FACTORES DE RIESGO DE LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR Y RENAL

Los hábitos de vida de la sociedad actual juegan un papel fundamental en el desarrollo de las enfermedades CV. La alimentación de nuestra sociedad se caracteriza por una ingesta de sal y de ácidos grasos saturados por encima de los niveles recomendados por la OMS, que junto con el sedentarismo, favorecen el aumento de obesidad y la prevalencia de diabetes en la población. Todo esto favorece la instauración de factores de riesgo como la hipertensión, la dislipemia y la diabetes mellitus que junto con el hábito de fumar, el envejecimiento de la población y los antecedentes familiares aumentan la probabilidad de sufrir enfermedades CV (OMS, 2013). Muchos de los factores de riesgo CV citados, son también factores de riesgo para el desarrollo de enfermedad renal crónica (Gansevoort y cols., 2013), como se puede observar en la siguiente tabla (tabla 2) en la que se detallan los factores de riesgo de enfermedad renal y su implicación en la aparición y/o progresión de la enfermedad (Ruilope y Bakris, 2011).

Tabla 2. Factores de riesgo de enfermedad crónica renal. Modificado de Ruilope y Bakris, 2011.

TIPO	FACTORES DE RIESGO	
Factores de predisposición	Edad	Disminución de la masa renal
	Género	Albuminuria
	Antecedentes familiares	Síndrome metabólico
	Enfermedad CV	Diabetes mellitus
	Obesidad	Presión sanguínea >125/75 mmHg
	Dislipemia	Anemia
Factores de iniciación	Desórdenes urológicos	Enfermedad renal primaria
	Nefrotoxinas	
Factores de perpetuación	Proteinuria	Presión sanguínea >130 mmHg
	Dislipemia	Alta ingesta de proteínas
	Enfermedad CV	Hiperuricemia
	Tabaquismo	Hipoproteinemia

1.4 RELACIÓN ENTRE ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR Y RENAL: CONTINUO CARDIORENAL

La enfermedad renal y CV están íntimamente relacionadas, de hecho, la presencia de enfermedad renal se asocia con una alta incidencia de padecer algún evento CV, hasta el punto de que los pacientes con enfermedad renal que evolucionan hasta el grado de insuficiencia renal son una minoría, ya que la mayoría muere por enfermedad CV antes de desarrollar insuficiencia renal (García-Donaire y cols., 2007). Dos ejemplos claros de esta relación entre el sistema renal y el CV son los siguientes, por un lado, en la población con una enfermedad vascular instaurada, la aparición de insuficiencia renal, incluso en los estadios menos graves, aumenta el riesgo de padecer una enfermedad coronaria (Segura y Ruilope, 2011), por otro

lado, la disminución del IFGe por debajo de 60 mL/min/1,73 m² es un predictor independiente de mortalidad por enfermedad CV en la población general (Matsushita y cols., 2010).

De acuerdo con esto, se propuso el término *continuo cardiorenal*, mediante el cual se reflejaban los distintos estadios tanto de enfermedad renal como de enfermedad CV, que se encuentran estrechamente relacionadas. Según este modelo, al principio, sólo son detectables los factores de riesgo CV, seguidamente, en el segundo estadio, se pueden observar las consecuencias de daño en los órganos diana, como por ejemplo en el riñón, la aparición de albuminuria y la disminución del IFGe o en el corazón, la hipertrofia del ventrículo izquierdo. Por último, el tercer estadio, se caracteriza por la presencia de daño en los órganos diana acompañado de sintomatología o por insuficiencia CV y/o renal establecidas (Ruilopec, 2012).

Factores de riesgo CV como un aumento de las lipoproteínas, resistencia a la insulina, aumento del estrés oxidativo, aumento de la velocidad de onda de pulso (VOP) como marcador de rigidez arterial, aumento de los niveles séricos de ácido úrico y de la actividad simpática, la presencia de marcadores inflamatorios y procoagulantes o la obesidad, entre otros, se asocian con una disminución del IFGe (Segura y Ruilope, 2005). Así mismo, la pérdida de la función renal se asocia con multitud de efectos adversos dentro de los cuales se encuentra el aumento del riesgo de muerte por enfermedad CV (van der Velde y cols., 2009; Satoh, 2012) incluso en la población general (Hillege y cols., 2002; Verhave y cols., 2004; Chang y cols., 2013). En este contexto, la guía KDIGO ha elaborado una tabla que se muestra a continuación (tabla 3) con los dos parámetros determinantes del estado renal (el IFGe y la albuminuria), mediante la que se clasifica, por colores, el riesgo de sufrir 5 eventos como son, mortalidad global, mortalidad CV, fracaso renal tratado con diálisis o trasplante, fracaso renal agudo y progresión de la enfermedad renal (Gorostidi y cols., 2014).

Tabla 3. Clasificación de la enfermedad renal crónica según la guía KDIGO (2012). El color verde corresponde a la categoría de menor riesgo de sufrir 5 eventos como son, mortalidad global, mortalidad CV, fracaso renal tratado con diálisis o trasplante, fracaso renal agudo y progresión de la enfermedad renal, el color amarillo corresponde a riesgo moderadamente aumentado, el naranja a riesgo alto y rojo a muy alto. Tomada de Gorostidi y cols., 2014.

KDIGO 2012 Filtrado glomerular Categorías, descripción y rangos (ml/min/1,73 m ²)			Albuminuria Categorías, descripción y rangos		
			A1	A2	A3
			Normal a ligeramente elevada	Moderadamente elevada	Gravemente elevada
			<30 mg/g ^a	30-300 mg/g ^a	>300 mg/g ^a
G1	Normal o elevado	≥ 90			
G2	Ligeramente disminuido	60-89			
G3a	Ligera a moderadamente disminuido	45-59			
G3b	Moderada a gravemente disminuido	30-44			
G4	Gravemente disminuido	15-29			
G5	Fallo renal	<15			

Son numerosos los estudios clínicos en los que se asocian la enfermedad renal y la enfermedad CV. En el estudio HOT (*Hypertension Optimal Treatment*), se concluyó que los valores de creatinina sérica eran predictores de riesgo CV, incluso cuando existía un buen control de la presión arterial (Zanchetti y cols., 2001). El estudio Hoorn mostró que una pérdida moderada de la función renal está asociada a un aumento del riesgo de muerte por causas CV (Henry y cols., 2002). De hecho, en el 7th JNC (*7th report of the Joint National Committee*) se reconoció que la presencia de albuminuria y valores del IFGe por debajo de 60 mL/min/1,73 m² como los dos mayores factores de riesgo de enfermedad CV (Chobanian y cols; 2003), de tal forma que en los estadios más tempranos de insuficiencia renal, se observa un aumento de la mortalidad CV, incluso en la población general (Ruilope y Bakris, 2011). En este sentido se ha descrito que la relación entre la función renal y el riesgo de sufrir eventos CV aparece en estadios tempranos de enfermedad CV y renal (Ruilope y Segura, 2006).

2 HIPERTENSIÓN ARTERIAL COMO FACTOR DE RIESGO CARDIOVASCULAR Y RENAL

Los valores de presión arterial dependen tanto del gasto cardíaco, como de la resistencia periférica que ofrecen los vasos sanguíneos. Y se controlan a través de diferentes mecanismos como son los barorreceptores arteriales, el metabolismo hidrosalino y el sistema renina-angiotensina (SRA). El SRA tiene un papel esencial en la regulación de los electrolitos y el volumen sanguíneo. La angiotensina II (Ang II) es el principal efector del SRA, ejerce su función

en numerosos órganos como el cerebro, el corazón, el riñón, las glándulas adrenales y los vasos periféricos para regular la presión sanguínea, la concentración de electrolitos y el volumen extracelular. Una estimulación inapropiada del SRA se asocia con hipertensión, infarto de miocardio e ictus (Lucisano y cols., 2013).

En el año 2003, la Sociedad Europea de Hipertensión (ESH) y la Sociedad Europea de Cardiología (ESC), establecieron una clasificación que se muestra a continuación (tabla 4) de los valores de presión arterial que no se ha modificado desde entonces (ESH/ESC, 2013).

Tabla 4. Definición y clasificación de los niveles de presión sanguínea. Modificado de ESH/ESC, 2013.

Categoría	Sistólica (mmHg)		Diastólica (mmHg)
Óptima	< 120	y	<80
Normal	120-129	y/o	80-84
Normal-alta	130-139	y/o	85-89
Hipertensión-grado 1	140-159	y/o	90-99
Hipertensión-grado 2	160-179	y/o	100-109
Hipertensión-grado 3	≥ 180	y/o	≥ 110
Hipertensión sistólica aislada	≥ 140	y	<90

Siguiendo esta clasificación se establece la hipertensión como los valores de presión arterial sistólica superiores a 140 mmHg y/o valores de presión arterial diastólica superiores a 90 mmHg (ESH/ESC, 2013). La hipertensión afecta a más de 1.000 millones de personas a nivel mundial, llegando a ser 9, los millones que cada año mueren por complicaciones asociadas a este aumento de la presión sanguínea (OMS, 2013). Este aumento de la presión arterial tiene consecuencias en varios órganos, puede afectar a la retina, al riñón, al cerebro y al sistema CV principalmente.

2.1 HIPERTENSIÓN COMO FACTOR DE RIESGO CARDIOVASCULAR

Datos obtenidos del estudio Framingham muestran que la prevalencia de morbilidad y mortalidad CV es mayor en individuos con presión arterial normal en comparación con aquellos que presentan una presión sanguínea óptima, y que esta prevalencia aumenta más en pacientes con valores de presión considerados como normal-alta (Vasan y cols., 2001). La hipertensión predispone a insuficiencia cardíaca, angina de pecho o infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, coronariopatía y enfermedad arterial periférica (JNC 7, 2003). A nivel vascular puede afectar a las distintas capas que forman la pared vascular, siendo causa y/o consecuencia de disfunción endotelial y rigidez arterial entre otras.

2.1.1 CONSECUENCIAS DE LA HIPERTENSIÓN A NIVEL VASCULAR

2.1.1.1 ESTRUCTURA DE LA PARED ARTERIAL

El sistema circulatorio consta de diversos tipos de vasos sanguíneos, que se pueden clasificar según el diámetro de la luz, el grosor y el componente mayoritario de la capa media en: arterias elásticas o de conducción y arterias musculares o de resistencia.

Histológicamente, la pared arterial consta de tres capas celulares que se diferencian tanto en la estructura como en la función. Desde el exterior hasta la luz del vaso se distinguen la adventicia, la capa media y la capa endotelial, separadas por dos láminas de elastina: la lámina elástica interna y la lámina elástica externa (figura 1). Los componentes de la pared arterial cumplen varias funciones, como dar soporte mecánico, participar en la actividad vasomotora y función metabólica.

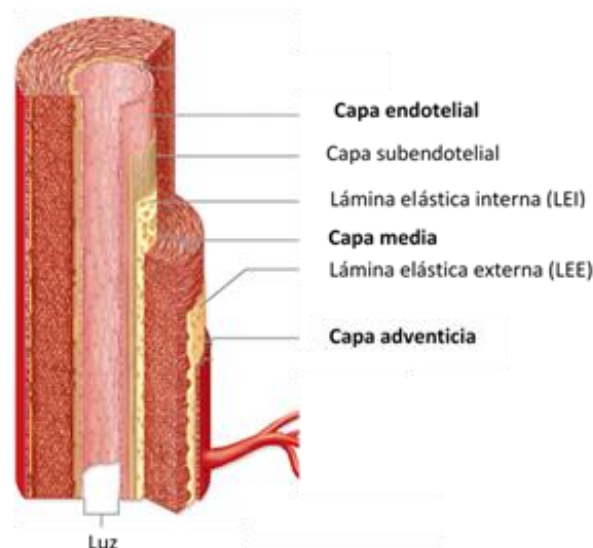


Figura 1. Estructura de la pared arterial. Modificado de Mescher AL. Junqueira's Basic Histology. Text and Atlas. 12th Edition, 2010.

2.1.1.2 DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

El endotelio se encuentra implicado en la regulación de numerosos procesos fisiológicos. Por un lado, forma una barrera de permeabilidad selectiva para el intercambio de sustancias entre la sangre y los tejidos. Y por otro, controla la coagulación sanguínea, la migración de las células a través de la pared vascular, la regulación del tono vascular y del flujo sanguíneo local mediante la liberación de distintos factores vasoconstrictores y otros vasodilatadores, para mantener un tono vascular adecuado según las demandas del organismo (Griendling y Alexander, 1996; Geneser, 2001).

La disfunción endotelial se puede definir como el conjunto de alteraciones que afectan a la síntesis, liberación, difusión, o degradación de los factores generados por el endotelio (Esteller, 2005). Es el resultado de la combinación de una respuesta vasodilatadora anormal por parte de las CE y de un desequilibrio en las sustancias que determinan el tono vascular que se producen o actúan sobre el endotelio (Chade y cols., 2013). La disfunción endotelial se caracteriza por la liberación de distintas moléculas como las especies reactivas de oxígeno (EROs), moléculas vasoconstrictoras como Ang II y endotelina (ET)-1 y por un desajuste entre citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias que producen un daño de las células del endotelio vascular y la consiguiente pérdida de su función. Estos hechos se traducen en una disminución de la biodisponibilidad del óxido nítrico (NO), que es el principal contribuyente a la dilatación vascular, un aumento de la permeabilidad vascular y la adhesión de células mononucleares y plaquetas a la superficie endotelial (Nieuwdorp y cols., 2006; Futrakul y cols., 2009). Por otro lado, los prostanoides derivados de la ciclooxigenasa (COX) endotelial también regulan la función vascular (Doroudi y cols., 2000; Shi y Vanhoutte, 2008). Dentro de este grupo hay prostanoides vasoconstrictores como por ejemplo el tromboxano A₂ o la prostaglandina H₂ (Katusic y cols., 1988) y otros con función vasodilatadora como la prostacilina (Félétou y Vanhoutte, 2006). La disfunción endotelial está implicada en la fisiopatología de la hipertensión, de la insuficiencia coronaria, insuficiencia cardíaca crónica, insuficiencia arterial periférica, diabetes e insuficiencia renal crónica entre otras (Chade, 2013).

2.1.1.3 RIGIDEZ ARTERIAL

La rigidez arterial se puede definir como la disminución de la distensibilidad y contractilidad de la pared arterial en respuesta a cambios de presión (Cecelja y Chowienczyk, 2012). Hoy en día el mejor determinante de la rigidez arterial es la medida de la VOP, es decir la velocidad con la que viaja el pulso en un determinado segmento arterial (Laurent y cols., 2016), de tal manera que se considera que un paciente tiene rigidez arterial a partir de un valor de VOP igual o mayor a 10 m/s según las guías ESH/ESC, 2013. Concretamente, la determinación de esta medida en la aorta es la más relevante, ya que esta arteria y sus primeras ramas, son las responsables de la mayoría de los efectos patológicos de la rigidez arterial (Mule y cols., 2009). Además, la rigidez arterial no se distribuye uniformemente sobre el árbol vascular, sino que aparece sobre todo, en vasos centrales y de conducción, siendo más moderada en las arterias periféricas.

El aumento de la rigidez arterial es un distintivo de los procesos de envejecimiento, pero también es un marcador de aumento de riesgo de padecer infarto de miocardio, insuficiencia

cardíaca, ictus, demencia y enfermedad renal (Coutinho y cols., 2011; Georgianos y cols., 2015). En el *Farmingham Heart Study* se confirmó que la rigidez arterial es un predictor de morbilidad y mortalidad en la población general, pacientes hipertensos, ancianos y pacientes con insuficiencia renal (Mitchell y cols., 2010). Con respecto a esta última se ha descrito que pacientes con rigidez arterial presentan también albuminuria y una disminución moderada del IFGe (Jia y cols., 2014).

- ***Mecanismo subyacente a la aparición de rigidez arterial***

La matriz extracelular (MEC) de la pared de los vasos sanguíneos se encuentra formada por colágeno, elastina, glicoproteínas y proteoglicanos. El colágeno y la elastina permiten la integridad estructural y elástica del vaso manteniendo un flujo sanguíneo continuo (Richart y cols., 2007). La proporción de estas dos macromoléculas se mantiene estable por un proceso dinámico de producción y degradación por la acción colagenolítica y elastolítica de las proteasas de MEC. Situaciones como un aumento de la presión arterial pueden desencadenar la desregulación de este equilibrio con la consiguiente disminución de elastina y la sobreproducción de colágeno en la pared arterial que forma una estructura menos efectiva, lo cual contribuye a la aparición de rigidez arterial (Avolio y cols., 1998; Laurent y cols., 2005). La histología de los vasos con rigidez muestra una colocación desordenada y anormal de las células endoteliales (CE), un aumento de colágeno, moléculas de elastina rotas y deshilachadas, infiltración de células de músculo liso vascular (CMLV), macrófagos y células mononucleares, un aumento de las proteasas de MEC, TGF β (factor de crecimiento transformante β), moléculas de adhesión celular y citoquinas (Shirwany y Zou, 2010).

2.2 HIPERTENSIÓN COMO FACTOR DE RIESGO RENAL

Los riñones juegan un papel muy importante en el origen de la hipertensión esencial, al igual que son uno de los principales órganos afectados por un aumento de la presión arterial (Ruilope, 2002). Por lo tanto, un aumento de la presión arterial puede ser tanto causa como consecuencia de la enfermedad renal crónica (García-Donaire y cols., 2007). El riñón, a través de su función de regulación del equilibrio hidrosalino y mediante el SRA, juega un papel muy importante en la regulación de la presión sanguínea. En EE.UU. la hipertensión es una de las principales causas de prevalencia de insuficiencia renal (Wadei y Textor, 2012). En este contexto, se ha descrito que la hipertensión es el mayor factor de riesgo en el desarrollo y progresión de la insuficiencia renal (Segura y Ruilope, 2011). Además, la prevalencia de la hipertensión aumenta gradualmente con el avance de la insuficiencia renal, siendo del 79,1% de los pacientes en estadio 1 y llegando al 95,5% en los pacientes en estadio 4 y 5 (Sarafidis y

cols., 2008). De tal forma, que dicha prevalencia se asocia estrechamente con la función renal (Wadei y Textor, 2012).

En las encuestas de salud estadounidenses NAHNES (*National Health and Nutrition Examination Survey*), en concreto NAHNES III, se concluyó con los datos obtenidos a partir de 15.600 individuos, que más del 40% de los participantes con un IFGe de 60-90 mL/min/1,73 m² presentaban niveles de presión arterial mayores o iguales a 140/90 mmHg. La prevalencia de los pacientes con hipertensión aumentaba más de un 75% en aquellos participantes con un IFGe menor de 30 mL/min/1,73m² (K/DOQI, 2002). Incluso se ha descrito que pacientes con valores de presión arterial de 120-129/80-84 mm Hg presentan un mayor riesgo de desarrollar enfermedad crónica renal en comparación con aquellos que presentaron valores de presión arterial considerados como óptimos (Huang y cols., 2014). Además, en los pacientes hipertensos la aparición de albuminuria se asocia con la disminución del IFGe (Segura y cols., 2006).

El otro parámetro indicador de la función renal, la albuminuria, también se ve afectado por la aparición de hipertensión. De hecho, se estima que la prevalencia de la albuminuria en la población con hipertensión es del 23% frente al 7% de la población general (Menne y cols., 2010) como se muestra en la figura 2.

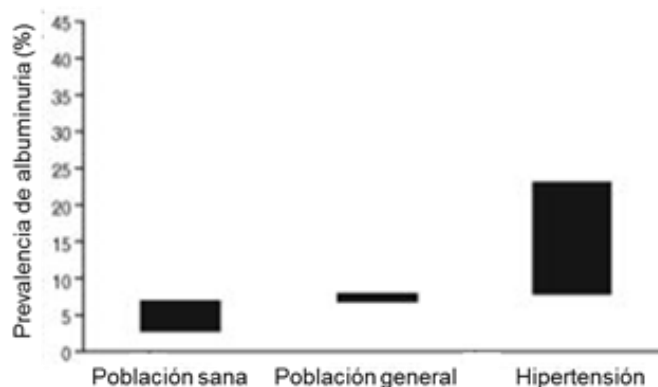


Figura 2. Prevalencia de la albuminuria en la población sana, población general y población con hipertensión.

Modificado de Menne y cols., 2010.

En este sentido, el desarrollo de albuminuria en pacientes hipertensos se observa especialmente en aquellos pacientes hipertensos que no están bien controlados (Segura y Ruilope, 2005; Dobre y cols., 2009). Además, la aparición de albuminuria en pacientes con hipertensión aumenta el riesgo CV. De hecho, los pacientes hipertensos que desarrollan insuficiencia renal muestran una probabilidad de sufrir eventos CV es 2,5 veces superior a aquellos que presentan una función renal normal (Segura y cols., 2004).

3 ALBUMINURIA COMO FACTOR DE RIESGO RENAL Y CARDIOVASCULAR

La albuminuria es el resultado del paso de la albúmina desde el plasma a la orina debido a una pérdida de la permeabilidad selectiva de la barrera de filtrado glomerular (BFG) (Macconi y cols., 2006). Como se detalló con anterioridad (tabla 1), la albuminuria se define como la excreción urinaria de albúmina, expresada como el cociente albúmina/creatinina, superior a 20 mg/g en hombres o superior a 30 mg/g en mujeres. A su vez la albuminuria se divide en función de su severidad en albuminuria moderada o alta, (aquellos valores >20 y ≤ 200 mg/g en hombres y >30 y ≤ 300 mg/g en mujeres) y albuminuria severa o muy alta (aquellos valores >200 mg/g en hombres y >300 mg/g en mujeres) (Gorostidi y cols., 2014).

La albuminuria puede aparecer como consecuencia del envejecimiento y en condiciones fisiológicas como el ejercicio físico, la postura, la hipoxia inducida por la altitud, etc. En este caso, la albuminuria desaparece al eliminarse la situación de estrés. Pero, también se asocia a condiciones patológicas como la hipertensión, anteriormente mencionada, el síndrome metabólico, y puede aparecer como consecuencia de numerosas enfermedades inflamatorias como periodontitis, hepatitis y colitis (Abdelhafiz y cols., 2011).

3.1 ALBUMINURIA COMO FACTOR DE RIESGO RENAL

Aunque la determinación de la función renal a través del IFGe es un importante marcador de enfermedad renal crónica, la albuminuria es un mejor predictor de la aparición de esta enfermedad (Iseki y cols., 2003; Gansevoort y cols., 2010; Ibrini y cols., 2012), incluso en la población general libre de otros marcadores de riesgo (van der Velde y cols., 2009; Cerasola y cols., 2010). Los individuos con un empeoramiento en el IFGe, pero que no presentan un aumento en la excreción urinaria de albúmina, tienen un riesgo moderado de padecer enfermedad renal. Por el contrario, los individuos con albuminuria tienen un alto riesgo de padecer enfermedad renal de forma independiente del IFGe, del género, de la edad y de los factores de riesgo CV incluso en la población general (van der Velde y cols., 2009; Hemmelgarn y cols., 2010). Se ha descrito, que la albuminuria puede aparecer antes incluso de que se observe ninguna modificación en el IFGe (Segura y Ruilope, 2005). Por lo tanto, la albuminuria se considera un marcador de enfermedad crónica renal, que no sólo predice su aparición, sino que también da información sobre su evolución, ya que a medida que aumenta la albuminuria disminuye la función renal. En un primer momento, la albuminuria puede ser un proceso

reversible que se vuelve crónico con la progresión de los cambios estructurales en el riñón a medida que avanza la enfermedad renal (Abdelhafiz y cols., 2011).

El empeoramiento de la función renal en la población general es muy frecuente y normalmente asintomático, lo cual favorece que exista un alto porcentaje de individuos que no están diagnosticados (Verhave y cols., 2004). Teniendo en cuenta este factor y el alto valor pronóstico de la albuminuria, se ha puesto de manifiesto la importancia de la determinación de la excreción urinaria de albúmina en toda la población, para localizar a los individuos en riesgo lo más rápido posible (Verhave y cols., 2004), ya que la determinación de la albuminuria sólo en la población con una enfermedad instaurada dejaría sin identificar a cerca de la mitad de los individuos en riesgo de padecer una enfermedad renal y/o CV (Gansevoort y cols., 2010).

3.2 ALBUMINURIA COMO FACTOR DE RIESGO CARDIOVASCULAR

En 1984 Mogensen fue el primero en describir la importancia de la albuminuria no solo como factor de riesgo renal, sino también como un poderoso predictor de mortalidad CV en pacientes con diabetes (Mogensen, 1984). En el estudio PREVEND (*Prevention of Renal and Vascular End-Stage Disease*) se concluyó que la albuminuria es un predictor de mortalidad CV independientemente de otros factores de riesgo CV en la población general (Hillege y cols., 2002). Sin embargo, en los últimos años también ha cobrado importancia como marcador pronóstico de riesgo CV y renal en individuos no diabéticos (Cerasola y cols., 2010).

La albuminuria se considera un factor de riesgo CV independiente (Segura y Ruilope, 2006), cuya aparición se asocia a un aumento de la incidencia de eventos CV (Segura y Ruilope, 2005). De hecho, el riesgo de sufrir un evento CV aumenta de forma dependiente con la cantidad de albúmina excretada. En este sentido, los individuos con albuminuria moderada tienen un 47% más de riesgo, y los que presentan albuminuria severa un 117% más de riesgo CV (Perkovic y cols., 2008).

En este contexto, se ha establecido una relación entre la aparición de albuminuria y el aumento de masa de ventrículo izquierdo (Segura y Ruilope, 2005). En el estudio LIFE (*Losartan Intervention for End-point Reduction in Hypertension*) se observó que un aumento de los niveles de excreción urinaria de albúmina se traducían en un aumento de la mortalidad CV en los pacientes hipertensos con hipertrofia de ventrículo izquierdo (Wachtell y cols., 2003). Además, se ha observado que la asociación entre excreción urinaria de albúmina y enfermedad CV empieza a establecerse a niveles inferiores de los considerados como

albuminuria moderada. Por esta razón, se ha propuesto disminuir el límite inferior dentro del cual se considera que aparece albuminuria (30 mg/g), ya que se ha observado que pacientes con un coeficiente albúmina/creatinina de 15-29,9 mg/g presentan aterosclerosis en la carótida y rigidez arterial en mayor medida que aquellos con valores de albuminuria por debajo de 15 mg/g (Lee y cols., 2012).

3.3 ESTRUCTURA Y FISIOPATOLOGÍA DE LA NEFRONA

La orina se forma en los riñones a partir de la filtración de las sustancias de desecho del organismo. Por esta razón, son órganos muy irrigados que presentan una estructura en la que se permite un estrecho contacto entre los vasos sanguíneos y las nefronas, que son las unidades funcionales del riñón. Las nefronas son células muy especializadas que se dividen en distintas partes como se muestra en la figura 3 de acuerdo con su función. El glomérulo renal, en el cual se produce la filtración de la sangre para formar una orina primaria muy diluida, y la porción tubular, en la que mediante procesos de reabsorción y secreción se continúa con el proceso de formación de la orina (Porth, 2009).

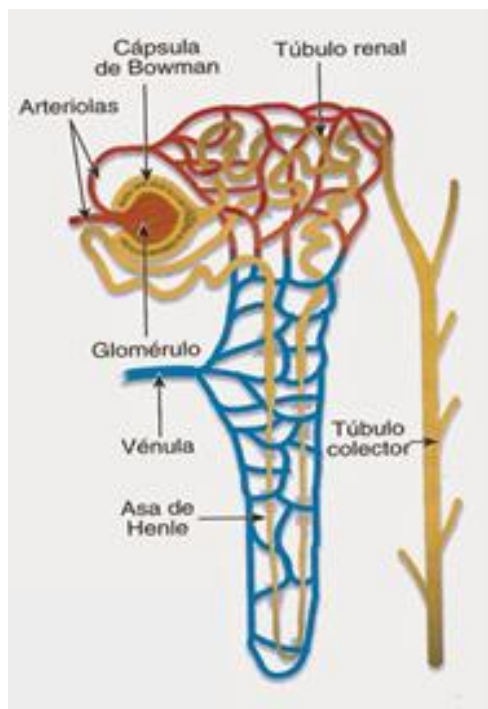


Figura 3. Modelo explicativo de la estructura de una nefrona. En esta imagen se pueden diferenciar las distintas partes que forman la nefrona. Las arteriolas que forman parte del glomérulo contenido en la cápsula de Bowman, el túbulo renal, el asa de Henle y las vénulas que la rodean y finalmente el túbulo colector.

El sistema de filtrado de sustancias de desecho a través de la BFG está diseñado de tal forma que sólo permite el paso de sustancias de bajo peso molecular de la sangre a la orina, impidiendo que se pierdan moléculas con función biológica para el organismo. La albuminuria puede ser el resultado de una sobre filtración glomerular o de una disminución en la reabsorción tubular o una combinación ambas (Abdelhafiz y cols., 2011). Si existe un daño glomerular que permite el filtrado de albúmina desde el torrente sanguíneo a la orina en formación, la mayor parte se reabsorbe por las células epiteliales del túbulo proximal en un proceso activo mediante el cual se devuelven al torrente sanguíneo (Tenten y cols., 2013). A continuación se detallarán las partes estructurales de la nefrona implicadas en la aparición de albuminuria.

3.3.1 BARRERA DE FILTRACIÓN GLOMERULAR Y DESARROLLO DE ALBUMINURIA

La BFG tiene un grosor de 250-400 nm y está formada por tres capas, dos de las cuales son celulares como se muestra en la figura 4. Una capa de CE que forman el endotelio glomerular, en contacto con el torrente sanguíneo, y una capa de células especializadas, llamadas podocitos en la parte más externa. Estas dos capas son las encargadas de generar una tercera, que es la MEC glomerular, también conocida como membrana basal glomerular, que se localiza entre medias de las dos (Suh y Miner, 2013).

BARRERA DE FILTRACIÓN GLOMERULAR

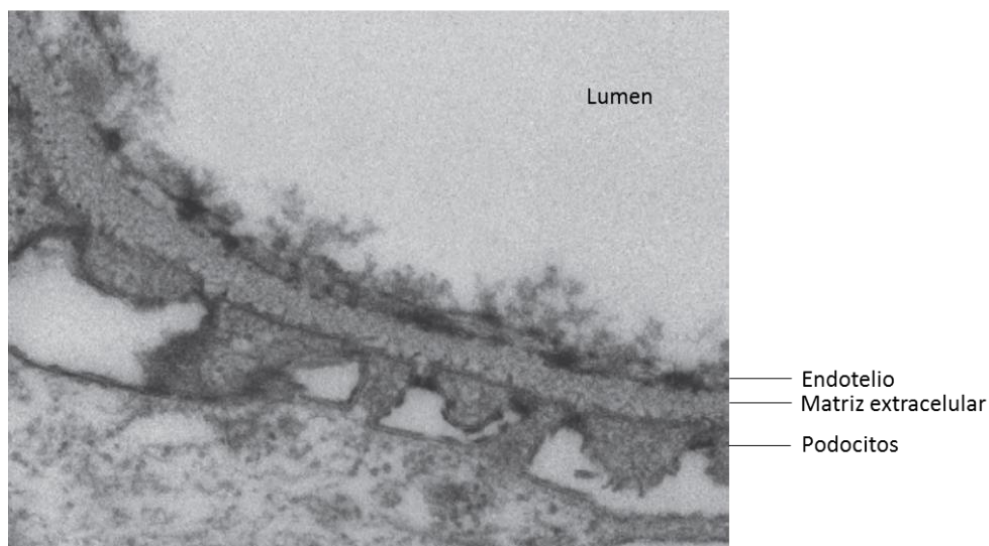


Figura 4. Micrografía electrónica de la barrera de filtración glomerular (x30000). Modificado de Rabelink y Zeeuw, 2015.

El daño en cualquiera de las partes que forman la BFG, desencadenará el paso patológico de sustancias de un peso molecular mayor, al que en situación fisiológica se retendrían en el

torrente sanguíneo (Zhang y cols., 2014). A continuación se profundizará en el estudio de cada una de las capas y en su contribución a la aparición de albuminuria.

3.3.1.1 ENDOTELIO GLOMERULAR FENESTRADO

La primera barrera con la que se encuentran los componentes sanguíneos es la capa endotelial fenestrada que forma los capilares del glomérulo. El endotelio que forma estos capilares difiere del resto porque presenta poros, denominados fenestras, con un tamaño entre 60-100 nm que comprenden el 20% de la superficie endotelial. La presencia de estos poros permite un aumento de la superficie de filtrado (Dane y cols., 2013) que se traduce en una permeabilidad al agua varios órdenes de magnitud superior a la que presentan otros lechos vasculares, existiendo una correlación directa entre la densidad de fenestras y la permeabilidad al agua (Satchell, 2013).

Las CE están recubiertas por un glicocáliz formado por un núcleo proteico (sindecanos) y cadenas laterales de heparán sulfato y de condroitín sulfato (Dane y cols., 2013) como se puede observar en la figura 5. Este glicocáliz juega un papel activo en el filtrado glomerular ya que además de disminuir el tamaño de poro de las fenestras, haciéndolas aún más restrictivas, confiere a la capa endotelial una carga negativa que repele a las moléculas plasmáticas que tienen la misma carga electrostática, como es el caso de la albúmina (Satchell, 2013).

ENDOTELIO GLOMERULAR FENESTRADO

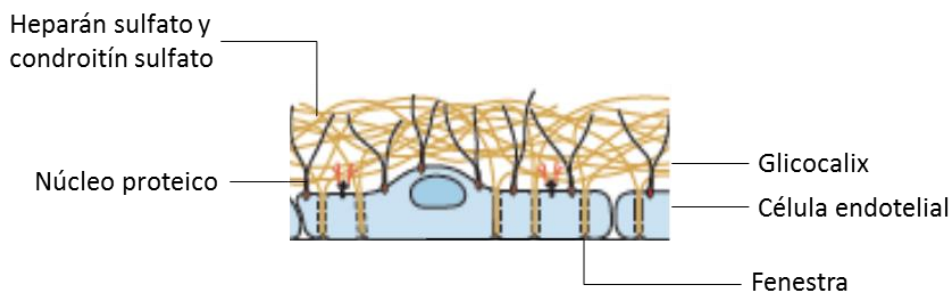


Figura 5. Modelo representativo de la estructura del endotelio glomerular fenestrado. Modificado de Rabelink y Zeeuw, 2015.

Los primeros estudios acerca de la permeabilidad selectiva de la BFG los realizaron Farquhar y Palade utilizando trazadores de varios tamaños y de diferente carga neta. De esta manera, demostraron que las moléculas de tamaño superior al de la albúmina al igual que aquellas que presentaban una carga neta negativa tenían restringido el paso a través dicha barrera (Farquhar y Palade, 1961; Farquhar y cols., 1961*; Brenner y cols., 1978). De hecho, la

destrucción enzimática de los distintos componentes de la capa endotelial produce una disminución de su profundidad y de su carga aniónica, que se traduce en un aumento de la excreción urinaria de albúmina. Conforme a esto, se ha observado que la infusión con hialuronidasa, produce la eliminación de los polisacáridos que forman el glicocálix de las CE fenestradas, permitiendo el paso de la albúmina a través del endotelio glomerular (Dane y cols., 2013).

Esta pérdida de la capa endotelial asociada a la aparición de albuminuria, también ocurre en procesos como el envejecimiento (Salmon y Satchell, 2012), y en patologías como la diabetes mellitus tipo I en la que una reducción del volumen del glicocálix endotelial sistémico se asocia a un aumento de la excreción urinaria de proteínas (Nieuwdorp y cols., 2006). Entre otros factores, las EROs, como se desarrollará en el punto 4.1.3.1, son los principales mediadores de las alteraciones y la destrucción del glicocálix endotelial (Vlahu y col., 2012; Singh y cols., 2013). A diferencia de otros lechos vasculares, el endotelio glomerular fenestrado no está en contacto con una capa de células musculares, sino que se encuentra en contacto directo con la MEC glomerular.

3.3.1.2 MATRIZ EXTRACELULAR GLOMERULAR

La siguiente capa que forma la BFG es la MEC, que se genera a partir de los podocitos y de las CE glomerulares durante el desarrollo glomerular. El hecho de que derive de dos tipos celulares distintos hace que sea una membrana de mayor grosor que el resto de las membranas de MEC del organismo (St. John y Abrahamson, 2001; Abrahamson, 2012).

La MEC está formada por laminina y colágeno tipo IV principalmente (Scott y Quaggin, 2015) y en menor proporción por nidógeno y proteoglicanos de heparán sulfato. Cada una de las moléculas que forman la MEC glomerular tiene una colocación específica, por ejemplo, el colágeno tipo IV y el nidógeno se localizan en la región central y las integrinas se localizan en la superficie de los podocitos (Scott y Quaggin, 2015). Esto permite que se entrelacen, dejando poros de un diámetro que va de los 4 a los 10 nm (Hironaka y cols., 1993). Este tamaño de poro juega un papel muy importante en el filtrado glomerular, haciendo de la MEC la segunda capa de control del paso de sustancias desde el torrente sanguíneo a la orina. Una desestructuración de la MEC, puede producir un aumento del tamaño de poro de la misma, permitiendo el paso de sustancias de mayor tamaño a la orina y por lo tanto generando albuminuria (Scott y Quaggin, 2015). Así mismo, se observó un empaquetamiento desestructurado de las fibras que forman la MEC glomerular, llegando a presentar un mayor

tamaño de poro, de hasta 40 nm de diámetro en un modelo animal de albuminuria (Hironaka y cols., 1996).

- **Laminina**

Las lamininas son proteínas que se secretan como heterómeros $\alpha\beta\gamma$ estabilizados por puentes disulfuro cuya combinación genera 15 tipos proteicos diferentes (Miner, 2011). Estas proteínas presentan sitios de unión a receptores de superficie celular como integrinas y distroglicanos (Suh y Miner, 2013). Además contienen un dominio N-terminal que es el responsable de las interacciones entre esta proteína y la MEC, lo cual, permite la generación de un polímero que se entrelaza y forma una red de laminina esencial para el mantenimiento de la integridad de la BFG (Smyth y cols., 1999). De hecho, se ha observado en roedores que la disminución de los niveles normales de laminina provoca albuminuria, hematuria e insuficiencia renal (Shannon y cols., 2006).

- **Colágeno tipo IV**

Es la proteína más abundante de la MEC glomerular, comprende alrededor del 50% de la masa proteica total de la MEC (Suh y Miner, 2013) y tiene una gran importancia en el mantenimiento de la estabilidad de la BFG (Miner, 2012). Es una proteína trimérica que consiste en 3 cadenas α ricas en residuos de glicina que se enrollan una sobre otra formando la triple hélice de colágeno. A diferencia de otros tipos de colágeno, en las moléculas de colágeno tipo IV, son comunes las interrupciones en esta repetición de residuos de glicina, lo cual genera moléculas más flexibles (Miner, 2011).

- **Proteoglicanos de heparán sulfato**

Están formados por un núcleo proteico central al cual se anclan residuos de glicosaminoglicanos sulfatados que confieren una carga negativa a la MEC (Suh y Miner, 2013). Entre las proteínas que forman los núcleos, se encuentran agrina, percelano y colágeno tipo XVIII (van den Hoven y cols., 2008; Goldberg y cols., 2009; Sachs y Sonnenberg, 2013; Suh y Miner, 2013). Aunque en un principio se creyó que la carga negativa aportada por la MEC contribuía a la carga neta negativa de la BFG y por lo tanto, al impedimento que esta genera al paso de sustancias cargadas negativamente del plasma a la orina, recientemente se ha demostrado que la ruptura de las cadenas laterales sulfatadas de los proteoglicanos de la MEC mediante el tratamiento con heparanasa, no favorece la aparición de albuminuria (Haraldsson y cols., 2008).

- **Nidógeno**

Estas proteínas actúan como nexo de unión de las redes de laminina y de colágeno tipo IV de la MEC (Miner, 2012) proporcionando una estabilidad extra a la BFG (Suh y Miner, 2013).

- **Receptores de adhesión matriz extracelular-célula. Integrinas y distroglicanos.**

Las integrinas son proteínas capaces de unir el citoesqueleto celular con la MEC, dando un refuerzo físico que confiere estabilidad frente a los cambiantes estímulos de estrés que sufre el glomérulo renal, ya que la adhesión de las células a la MEC se puede modular por alteraciones en la activación de las integrinas o por el nivel de estas proteínas en la superficie celular (Sachs y Sonnenberg, 2013). Los distroglicanos son proteínas encargadas de unir la actina del citoesqueleto a las moléculas de laminina.

Aunque la composición de la MEC que forma la BFG ha sido ampliamente estudiada, todavía van surgiendo nuevas proteínas en su composición como son el colágeno tipo VI y TINAGL1 (*TubuloInterstitial Nephritis AntiGen Like 1*), cuya función está todavía por determinar (Lennon y cols., 2014).

3.3.1.3 PODOCITOS

La tercera y última capa que forma la BFG son los podocitos. Son células polarizadas que presentan un cuerpo arborizado con múltiples proyecciones que se subdividen formando pedicelos que se anclan a la MEC glomerular aumentando así la superficie de filtrado (Sachs y Sonnenberg, 2013).

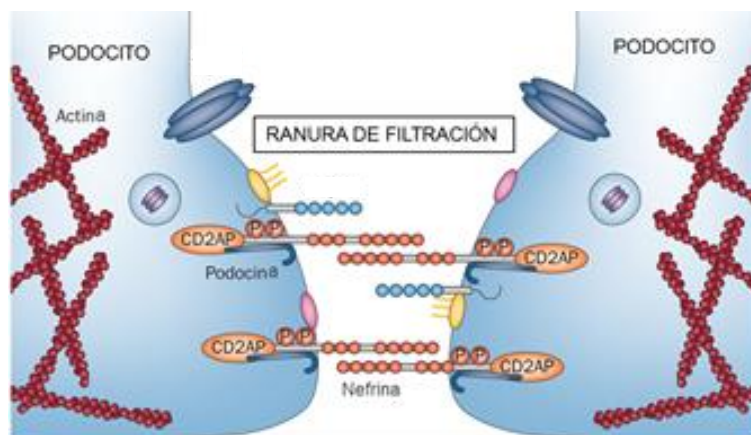


Figura 6. Modelo representativo de la estructura de los podocitos glomerulares. En esta figura se puede observar las proteínas nefrina y podocina que forman parte de la ranura de filtración, la proteína adaptadora CD2AP y la actina que forma parte del citoesqueleto de los podocitos. Modificado de Grahammer y cols., 2013.

Los podocitos se unen entre sí gracias a estructuras intercelulares denominadas ranuras de filtración que están formadas por las proteínas nefrina y podocina como se muestra en la figura 6. Estas estructuras son el portal de salida de la orina primaria, y además tienen la función de retener componentes plasmáticos de alto peso molecular. Por lo tanto, el daño en la estructura que forman los podocitos puede desencadenar la aparición de albúmina en orina (Scott y Quaggin, 2015). La expresión de nefrina se suprime en condiciones patológicas y se asocia a una pérdida de la selectividad de la BFG y por lo tanto, al desarrollo de albuminuria (Lucisano y cols., 2013). Tanto en modelos experimentales como en pacientes con una elevada excreción urinaria de albúmina, se ha observado la pérdida de podocitos glomerulares (Macconi y cols., 2006). Esto se debe a que los podocitos dañados pueden desprenderse de la MEC glomerular, provocando la disminución en su número que acompaña a la progresión de la enfermedad renal (Ijpeelaar y cols., 2008).

3.3.1.4 RELACIÓN ENTRE LOS DISTINTOS COMPONENTES DE LA BARRERA DE FILTRADO GLOMERULAR

Las tres capas que forman la BFG se encuentran relacionadas entre sí, de tal manera que el daño en cualquiera de ellas desencadena el daño en las otras, y la consiguiente aparición de albuminuria (Miner y cols., 2013). Por ejemplo, el aumento del paso de albúmina a través del endotelio puede desencadenar una saturación de los mecanismos fisiológicos de aclaramiento de los podocitos y por lo tanto dañarlos (Satchell, 2013). Los podocitos a su vez tienen un papel muy importante sobre la proliferación, la supervivencia y el desarrollo de las CE, ya que son los encargados de liberar distintos factores esenciales para el desarrollo normal del endotelio glomerular como son las angiopoyetinas (Scott y Quaggin, 2015). Cuando existe un daño en el glomérulo, la consiguiente pérdida de podocitos disminuye la producción de factor de crecimiento endotelial produciendo un aumento en el daño endotelial, que a su vez incrementa el daño en los podocitos (Futrakul y cols., 2009). Además, tanto los podocitos como las CE, pueden regular el remodelado de la MEC a través de la síntesis, degradación, reensamblaje y modificaciones químicas de sus componentes. Estos procesos son complejos y requieren una regulación muy estrecha para mantener la homeostasis del tejido, especialmente en procesos de respuesta a una lesión. De hecho, la desregulación del remodelado de la MEC está asociado con condiciones patológicas que pueden incluso exacerbar la progresión de la enfermedad (Bonnans y cols., 2014) como se estudiará en el punto 4.2.3.

La MEC, además de restringir el paso de sustancias a la orina en función de su tamaño, estabiliza de manera efectiva la BFG, ya que permite el anclaje de los podocitos y las CE glomerulares gracias a interacciones célula-MEC (Scott y Quaggin, 2015). Los componentes de la MEC interactúan constantemente, comportándose como ligandos de receptores celulares como las integrinas, regulando la adhesión, migración, proliferación, apoptosis, supervivencia o diferenciación celular. La MEC puede retener y liberar localmente factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento epidérmico o de fibroblastos, que se liberan tras la proteólisis de las moléculas de heparán sulfato. Además, la escisión de las glicoproteínas puede generar fragmentos de las mismas con funciones diferentes a aquellas que presenta la proteína de origen (Bonnans y cols., 2014).

3.3.2 TÚBULO RENAL Y DESARROLLO DE ALBUMINURIA

La orina, una vez filtrada por el glomérulo, sufre un proceso de reabsorción en el túbulo renal. Este es un proceso altamente selectivo, en el que se produce de forma fisiológica la reabsorción de sustancias como glucosa, aminoácidos y de forma dependiente a las necesidades del organismo de iones como sodio, cloro o bicarbonato (Guyton y Hall, 2005). Un aumento de la filtración de moléculas como la albúmina a través del glomérulo, produce un aumento de su reabsorción por parte de las células tubulares, desencadenando una respuesta inflamatoria en el túbulo y el consiguiente daño del mismo, lo cual favorece la progresión de la insuficiencia renal (Mennuni y cols., 2014; Rabelink y Zeeuw, 2015).

3.4 CAUSAS DE ALBUMINURIA ASOCIADAS CON LA HIPERTENSIÓN

En 1974, Parving y cols. describieron que la hipertensión esencial y la albuminuria estaban asociadas. Observaron la presencia de albúmina en orina en aquellos pacientes hipertensos que no se encontraban bien controlados, en comparación con aquellos que sí estaban controlados y con pacientes normotensos (Parving y cols., 1974). En los pacientes hipertensos la aparición de albuminuria se debe más a un aumento del paso transglomerular de la misma, que al resultado de la disminución de la reabsorción de albúmina en el túbulo proximal (Cerasola y cols., 2010). Se han propuesto dos mecanismos para explicar la aparición de la albuminuria en pacientes con hipertensión esencial: i) un aumento de la presión hidrostática glomerular y ii) un aumento de la permeabilidad de la BFG producida principalmente por la pérdida de la funcionalidad del endotelio glomerular.

3.4.1 AUMENTO DE LA PRESIÓN HIDROSTÁTICA GLOMERULAR

La presión hidrostática glomerular se regula mediante la vasoconstricción/vasodilatación de las arteriolas glomerulares tanto aferentes como eferentes. Normalmente, un aumento de la presión sanguínea sistémica se traduce en una vasoconstricción de las arteriolas aferentes, lo cual previene la transmisión del aumento de la presión al glomérulo y los posibles daños que pueda causarle (Cerasola y cols., 2010). Sin embargo, este mecanismo puede fallar porque: i) la adaptación de las arteriolas aferentes glomerulares sea defectuosa (Cerasola y cols., 2010); ii) la presión sistémica sea tan elevada que exceda la capacidad de compensación (Mennuni y cols., 2014); iii) se produzca un aumento de la contracción vascular como por ejemplo, por la liberación local de moléculas vasoconstrictoras. Estas situaciones producen una hipertrofia de los vasos sanguíneos o una constricción de las arteriolas eferentes, que se traduce en una disminución del área de filtrado y una elevación de la presión hidrostática intraglomerular que genera un aumento de la presión de filtrado a través de la BFG, aumentando de esta manera la permeabilidad de los capilares glomerulares (Futrakul y cols., 2009). Esta situación puede darse aunque haya una presión sistémica normal (Cerasola y cols., 2010).

3.4.2 DISFUNCIÓN ENDOTELIAL

La disfunción endotelial se ha propuesto como nexo de unión entre la hipertensión y la albuminuria (Hermans y cols., 2007; Satchell, 2013). La disfunción endotelial juega un papel muy importante en la enfermedad renal ya que está implicada en la iniciación y el desarrollo de albuminuria. Se considera que la aparición de albuminuria es un reflejo de disfunción generalizada del endotelio que afecta a todos los lechos vasculares, incluyendo los que irrigan cerebro, ojos, corazón y riñones, razón por la cual puede considerarse a la albuminuria como marcador de riesgo CV (Segura y Ruilope, 2001; Abdelhafiz y cols., 2011). Incluso se ha propuesto que la disfunción endotelial ocurre antes que el establecimiento de la albuminuria en enfermedades como la diabetes mellitus tipo I (Satchell y Tooke, 2008).

A nivel renal la disfunción endotelial y la consiguiente pérdida de la carga negativa del glicocálix endotelial contribuye al aumento de la permeabilidad de la BFG. De hecho, existen estudios en los que se asocia una pérdida de volumen del glicocálix que forma parte de los vasos sanguíneos glomerulares con la aparición de albuminuria (Rabelink y Zeeuw, 2015). Por otro lado, el aumento de la vasoconstricción producido por la disfunción endotelial puede producir hipoxia tisular y generar el consiguiente daño en el tejido, contribuyendo a la pérdida de la función renal (Chade, 2013).

3.5 ALBUMINURIA Y RIGIDEZ ARTERIAL

La rigidez arterial depende de la edad y de la presión sanguínea sistólica incluso en individuos normotensos. Enfermedades como la insuficiencia renal se asocian a un aumento de la rigidez arterial a través de varios mecanismos, como la calcificación vascular, un aumento del volumen sanguíneo, inflamación, disfunción endotelial y estrés oxidativo (Jia y cols., 2014). De hecho, la asociación entre la VOP y el grado de albuminuria es mayor en pacientes con prehipertensión que en pacientes normotensos (Kim y cols., 2011). Además se ha propuesto a la albuminuria como marcador temprano de rigidez arterial (Huang y cols., 2014) y existen evidencias que asocian la rigidez arterial con la albuminuria y marcadores inflamatorios (Mule y cols., 2009; Cerasola y cols., 2010). Un aumento en los valores de la excreción urinaria de albúmina, incluso con valores que se encuentran por debajo de los considerados como albuminuria moderada, se asocian con un aumento de la rigidez arterial (Mule y cols., 2010). Se ha descrito una asociación entre un empeoramiento de la función renal y una disminución en la elasticidad arterial, en este contexto, la albuminuria y una reducción moderada del aclaramiento de creatinina están relacionadas con un aumento de la VOP entre carótida y femoral, que ejercen sinérgicamente un efecto desfavorable sobre la rigidez arterial (Mule y cols., 2010).

El nexo de unión entre la rigidez arterial y la albuminuria no se conoce del todo, pero un posible mecanismo que puede relacionarlas es la disfunción endotelial descrita anteriormente. Esta juega un papel importante en el remodelado de la pared arterial a través de cambios estructurales y funcionales en las propiedades del endotelio vascular, que pueden desembocar en la aparición de rigidez arterial. Estos factores pueden afectar también a los vasos glomerulares, y por consiguiente, modificar la permeabilidad de la BFG y permitir la excreción urinaria de albúmina. Otra posible explicación es que la rigidez arterial puede aumentar la presión de carga de los vasos, lo cual contribuye al daño glomerular (Woodard y cols., 2015). Además, durante la insuficiencia renal es común que ocurra un desequilibrio de iones como calcio y fósforo, este factor favorece el depósito de calcio en las arterias, y por lo tanto, su calcificación, contribuyendo a la aparición o progresión de la rigidez arterial (Jia y cols., 2014).

4 MECANISMOS COMUNES IMPLICADOS EN LA ENFERMEDAD RENAL Y CARDIOVASCULAR

En el siguiente esquema se muestran algunos de los mecanismos implicados en la aparición de dos de los principales factores de riesgo tanto de la enfermedad CV como de la renal, como son la hipertensión y la albuminuria (figura 7).

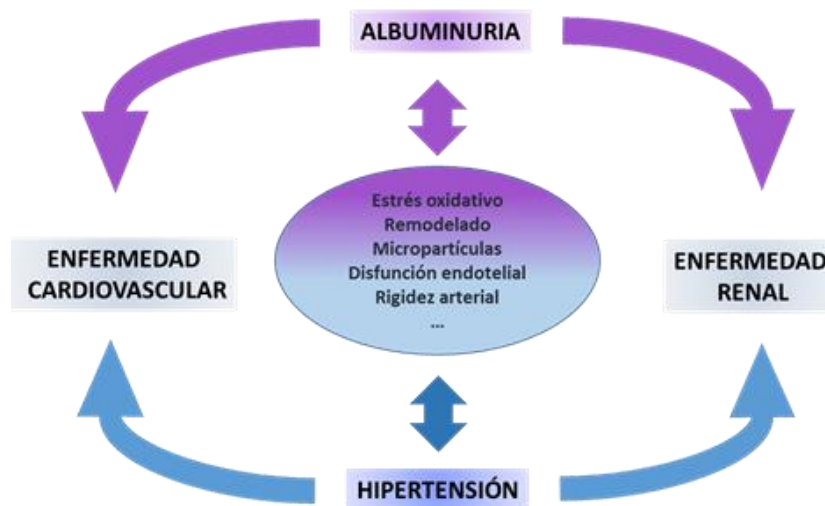


Figura 7. Principales mecanismos implicados en la hipertensión y la albuminuria como principales factores de riesgo de la enfermedad cardiovascular y la enfermedad renal

4.1 ESTRÉS OXIDATIVO

Las EROs se generan como producto del metabolismo celular normal y pueden desempeñar funciones tanto beneficiosas como perjudiciales. Mientras que a concentraciones moderadas desempeñan funciones fisiológicas importantes como, por ejemplo, la contribución en la defensa frente a agentes infecciosos o la regulación de numerosos procesos de señalización celular al actuar como segundos mensajeros (Valko y cols., 2007), a concentraciones elevadas están implicadas en la aparición de estrés oxidativo. Su alta reactividad hace que puedan interaccionar con proteínas, lípidos y ADN (Ácido desoxirribonucleico), produciendo efectos nocivos en la célula que favorecen el desarrollo de enfermedades CV incluyendo hipertensión, aterosclerosis, diabetes, hipertrofia e insuficiencia cardíaca, ictus (Paravinci y Touyz, 2008), pero sobre todo, tienen un papel muy importante en el desarrollo y progresión de la patología renal como se verá en el punto 4.1.3.

4.1.1 GENERACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

Se puede dividir a las EROs en dos grupos, los radicales libres y los derivados de O_2 no radicalarios (Paravinci y Touyz, 2008). El anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) se considera la ERO primaria, puesto que es la primera que se genera. Puede reaccionar con otras moléculas, dando como resultado la formación de otras EROs secundarias (Valko y cols., 2005). El $O_2^{\cdot-}$ se genera principalmente en las mitocondrias debido a la liberación de electrones que tiene lugar durante la formación de adenosín trifosfato (ATP) a través de la cadena de transporte electrónico (Cadenas y Sies, 1998), mediada por la NADH deshidrogenasa. Otra fuente de $O_2^{\cdot-}$ es la manganeso superóxido dismutasa (Mn-SOD) (Lezza y cols., 1994).

El $O_2^{\cdot-}$ puede dar lugar a la formación de otras EROs como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), tanto de forma espontánea en disolución acuosa (Rabani y Nielsen, 1969), como mediante la acción de la superóxido dismutasa (SOD) (Fridovich, 1974 y 1975) o unirse con el NO para formar radicales peroxinitrito ($ONOO^{\cdot-}$) (Lezza y cols., 1994). Por otro lado, el H_2O_2 es capaz de inducir la formación del radical hidroxilo (OH^{\cdot}) que presenta una alta capacidad oxidante.

4.1.1.1 SISTEMAS ENZIMÁTICOS IMPLICADOS EN LA GENERACIÓN DE EROs

- **NADPH oxidasa**

El complejo NADH/NADPH (Dinucleótido reducido de nicotinamida y adenina/ Dinucleótido fosfato reducido de nicotinamida y adenina) oxidasa es uno de los principales generadores de $O_2^{\cdot-}$ a nivel renal. La NADPH oxidasa se define como una familia de enzimas transmembrana capaces de transportar electrones y de generar EROs. Se encuentra unida a la membrana de las CE, de las CMLV y de los fibroblastos (Touyz y cols., 2002; Lassegue y Clempus, 2003). Estas enzimas constan de diferentes subunidades y, en función de ellas, se diferencian distintas isoformas. La NADPH prototípica, también denominada NOX2, consta de 5 subunidades: una subunidad estabilizadora ($p22^{phox}$), varias subunidades reguladoras ($p40^{phox}$, $p47^{phox}$, $p67^{phox}$) y la subunidad catalítica ($gp91^{phox}$), que es la que transfiere los electrones. Además, se conocen otras 6 isoformas diferentes que son la NOX1, NOX3, NOX4, NOX5, Duox1 y Duox2. Se encuentran en muchos tejidos y participan en la regulación de numerosas funciones fisiológicas (para revisión ver Griendling, 2006). Por otro lado, se han descrito una serie de factores como la Ang II, la ET-1 o el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), entre otros, que son capaces de regular su actividad (de Keulenaer y cols., 1998; Liu y cols., 2003; Pu y cols., 2003; Fortuño y cols., 2005). De todos estos, la activación de las NOX por la Ang II a través del receptor 1 de angiotensina II (AT1) parece ser la más importante (Montezano y cols., 2015).

También pueden aumentar su actividad cambios en las fuerzas hemodinámicas, como un aumento de la presión arterial (Ungvari y cols., 2003; Minoru Satoh, 2012).

- **NOX5**

NOX5 es una NADPH oxidasa dependiente de Ca^{2+} . A diferencia de la demás isoformas la unión a un ion de Ca^{2+} produce un cambio conformacional que favorece su activación. Existen 5 isoformas de NOX5, α , β , δ , γ y ϵ (Yu y cols., 2014) que se localizan en células inflamatorias como monocitos y macrófagos, en los nódulos linfáticos, en las CMLV, en el corazón, los riñones, el bazo y los testículos (Katsuyama y cols., 2010; Montezano y cols., 2015; Manea y cols., 2015). Sin embargo, no se expresa en roedores, lo cual dificulta su estudio, y hace que sea la isoforma de NADPH menos estudiada de la familia. A pesar de ello, se ha descrito que junto con NOX4, es la más importante de las isoformas en las arterias de resistencia en humanos (Chen y cols., 2014). La expresión de NOX5 vascular se encuentra aumentada en patologías como aterosclerosis, infarto agudo de miocardio, aneurisma, hipertensión y diabetes (Gole y cols., 2014; Chen y cols., 2014; Montezano y cols., 2015), contribuyendo al aumento de O_2^- , a la disminución de la biodisponibilidad de NO y por lo tanto, a la consiguiente disfunción endotelial (Chen y cols., 2014). Existen evidencias de que a nivel renal se expresa en los podocitos del glomérulo y en las células del túbulo proximal, siendo en estas últimas la isoforma predominante (Yu y cols., 2014). NOX5, al igual que el resto de NADPH oxidasas se regula por Ang II, lo cual sugiere su participación en el daño renal inducido por hipertensión (Holterman y cols., 2015). De hecho, en pacientes con hipertensión esencial, la expresión de NOX5 en el glomérulo es superior a la del resto de NADPH oxidasas (Yu y cols., 2014), contribuyendo al desarrollo de albuminuria, al daño podocitario y al engrosamiento de la BFG (Holterman y cols., 2014).

4.1.1.2 Otros sistemas enzimáticos productores de EROs

Otras enzimas que también pueden generar EROs son la xantina oxidasa (Li y cols., 2014), la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) desacoplada (Widder y cols., 2007; Paravinci y Touyz, 2008; Li y cols., 2014), el citocromo P-450 o la lipooxigenasa y la COX durante la síntesis de leucotrienos, tromboxanos y prostaglandinas (Stocker y Keaney, 2005; Bonomini y cols., 2008).

4.1.2 SISTEMAS DE DEFENSA ANTIOXIDANTE

Los sistemas de defensa antioxidante constituyen una serie de mecanismos diseñados para garantizar la supervivencia de la célula frente a una situación de estrés oxidativo. Estos mecanismos son diferentes dependiendo de si actúan en compartimentos intracelulares o

extracelulares, diferenciándose en dos grandes grupos: i) los sistemas antioxidantes enzimáticos como la SOD, la catalasa y el sistema glutathion peroxidasa, glutathion reductasa y ii) los sistemas antioxidantes no enzimáticos, como el glutathion, las vitaminas C, D y E, los carotenoides, la melatonina, el ácido úrico o la bilirrubina (Bensasson y cols., 1976; Davies y cols., 1986; Pieri y cols., 1995; Alleva y cols., 1995; Atkinson y cols., 2008).

• **Superóxido dismutasa**

La SOD constituye la primera defensa enzimática que presenta la célula frente a la excesiva producción de O_2^- ya que cataliza la dismutación de éste en H_2O_2 . En mamíferos se han descrito tres isoformas diferentes: i) la Cu-Zn SOD o citosólica (SOD1), que representa el 50-80% de la SOD vascular total; ii) la Mn-SOD o mitocondrial (SOD2) (Fridovich, 1974 y 1975; McCord y Fridovich, 1988) y iii) la isoforma extracelular de la Cu/Zn-SOD (EC-SOD o SOD3), la segunda más expresada en vasos y mayoritariamente producida por las CMLV (para revisión ver Faraci y Didion, 2004). La SOD2 se expresa mayoritariamente en CE y en menor proporción en CMLV, y es una de las más importantes en los vasos. El trabajo de Madamanchi y cols. (2005) demuestra que animales que no expresan SOD2 presentan niveles superiores de O_2^- cuando se comparan con animales que no expresan SOD1.

4.1.3 CONTRIBUCIÓN DE LAS EROs AL DAÑO RENAL Y A LA ALBUMINURIA

Las EROs se generan en grandes cantidades de forma fisiológica en el riñón, reflejando el alto nivel de consumo de oxígeno que caracteriza al metabolismo de este órgano (Guidet y Shah, 1989). Las EROs a nivel renal se producen en las arteriolas, las células glomerulares y tubulares y en los podocitos (Mennuni y cols., 2014). Tienen diversas funciones sobre la fisiología renal, regulan la función celular y modulan la producción de MEC y su degradación. Pero en condiciones patológicas, el aumento de agentes vasoactivos y las fuerzas mecánicas como un aumento en la presión intraglomerular favorecen la activación del SRA, con el consiguiente aumento de Ang II, que regula al alza a la NADPH oxidasa, lo que dispara la producción de EROs (Satoh, 2012; Tan y cols., 2015). En la patología renal, este aumento de la producción de oxidantes a través de la NADPH oxidasa se acompaña por una disminución en la capacidad antioxidante, debida a una disminución de la actividad de SOD. Esta condición pro-oxidante puede ser uno de los principales mecanismos desencadenantes de la enfermedad renal o empeorar una patología ya existente (Tan y cols., 2015). En consecuencia, el aumento del estrés oxidativo correlaciona con la pérdida de función renal a medida que evoluciona la enfermedad renal (Dounousi y cols., 2006). En estudios recientes se ha observado un aumento

de marcadores de estrés oxidativo en pacientes diabéticos con albuminuria, en comparación con pacientes con normoalbuminuria (Piarulli y cols., 2009). Las EROs producen una acción perjudicial en el riñón a varios niveles, principalmente sobre el endotelio glomerular fenestrado y sobre la MEC que forma parte de la BFG.

4.1.3.1 ACCIÓN DE LAS EROs SOBRE EL ENDOTELIO DE LOS VASOS RENALES

En patologías como la diabetes mellitus se ha descrito que, anterior al establecimiento de la albuminuria, existe un daño inicial en el endotelio del glomérulo. Uno de los aspectos más importantes de este daño glomerular es la disrupción del glicocáliz que forma parte del endotelio, debido a la acción de distintos factores entre los que se encuentran las EROs (Satchell y Tooke, 2008). El glicocáliz de la capa endotelial tiene también sitios de unión para enzimas antioxidantes como la xantina oxidasa y la SOD, por lo tanto tiene su propia capacidad de eliminación de radicales libres (Singh y cols., 2013). Por ello, la pérdida del glicocáliz endotelial expone al endotelio vascular a los efectos perjudiciales de las EROs y a la disfunción endotelial (Singh y cols., 2013). Esta situación favorece un aumento del paso de macromoléculas a través de la BFG contribuyendo a la aparición de albuminuria (Satoh, 2012). Esto se ha comprobado a nivel experimental mediante el tratamiento de CE glomerulares con H_2O_2 o con OH^- , observándose en el glicocáliz un desprendimiento de los residuos de heparán sulfato o una disminución en su sulfatación y un aumento del paso de macromoléculas, lo cual se traduce en la exacerbación de la progresión de enfermedades como la nefropatía diabética (Nagasu y cols., 2016).

Por otro lado, además de la elevación de las EROs en el glomérulo, la albuminuria se ha asociado con una disminución del NO (Satoh, 2012). Uno de los mecanismos propuesto para explicar esta situación es que las EROs pueden combinarse con el NO produciendo moléculas como el peroxinitrito ($ONOO^-$) o el ácido peroxinitroso ($ONOOH$). Como resultado de esta reacción se produce una disminución de la biodisponibilidad de NO (Vaziri y cols., 2002; Prabhakar y cols., 2007) lo cual contribuye a la disfunción endotelial y al aumento de la vasoconstricción característica de las enfermedades renales como la nefropatía diabética o el daño renal agudo (Singh y cols., 2013). Además, el $ONOO^-$ y el $ONOOH$ son capaces de reaccionar con lípidos, ADN y proteínas alterando su capacidad funcional y generando compuestos citotóxicos en el riñón y los vasos sanguíneos. En enfermedades como la diabetes, existen evidencias que sugieren que el aumento en la producción de EROs es un denominador común en la progresión del daño vascular (Nagasu y cols., 2016).

4.1.3.2 ACCIÓN DE LAS EROS SOBRE LAS PROTEÍNAS DE MATRIZ EXTRACELULAR

El estrés oxidativo contribuye al daño de los vasos sanguíneos del riñón a través del crecimiento celular, el depósito de proteínas de MEC, la activación de proteasas de matriz extracelular, la inflamación, y a través de la disfunción endotelial y el aumento del tono vascular (Paravinci y Touyz, 2008; Nerpin y cols., 2012). Este aumento de EROs produce la modificación de lípidos generando productos de peroxidación lipídica como el malóndialdehído (MDA), la modificación de proteínas generando productos de oxidación irreversible como carbonilos (Nathan y Cunningham-Bussel, 2013) y la modificación de carbohidratos, de ADN y de otras moléculas. Estas modificaciones estructurales que a su vez producen una modificación en su función al acumularse, contribuyen a la aparición de complicaciones tanto en la enfermedad CV como renal (Vaziri y cols., 2002). En la enfermedad renal, el aumento del estrés oxidativo es capaz de modular los depósitos de MEC, característicos de procesos como la glomerulosclerosis, o producir cambios morfológicos en la MEC glomerular. Así mismo, un aumento de EROs es capaz de dañar las moléculas de laminina y proteoglicanos de heparán sulfato, afectando a su síntesis y/o a su degradación (Wang y cols., 2015).

La activación de la heparanasa por parte de las EROs, favorece la degradación de los proteoglicanos de heparán sulfato, lo cual produce la disminución de la carga negativa característica del endotelio glomerular. Además, en modelos experimentales se ha demostrado que el H₂O₂ causa la disminución de la síntesis de proteoglicanos de heparán sulfato en un 75%, mientras que no modifica ni su tamaño ni su carga. En este sentido, su síntesis se restaura gracias al tratamiento con catalasa (Kashihara y cols., 1992).

Las EROs también son capaces de aumentar la degradación y modificar el entrelazado de las moléculas de colágeno tipo IV alterando a su vez las propiedades permeables de la BFG (Mohamed y cols., 2006) comprometiendo tanto el endotelio glomerular, como la MEC y por consiguiente induciendo la aparición de albuminuria (Kuwabara y cols., 2010; Nagasu y cols., 2016). Por otro lado, el aumento de la producción endotelial de EROs induce el daño podocitario. En pacientes con nefropatía diabética, la pérdida de podocitos se asocia con una disminución de las fenestras del endotelio. A su vez, el aumento del estrés oxidativo derivado de la mitocondria en las células del endotelio glomerular produce una depleción podocitaria en modelos animales de nefropatía diabética (Nagasu y cols., 2016). Así mismo, se ha observado que la activación podocitaria y la expansión de la MEC aumentan en ratones transgénicos con sobre expresión de NOX2 de forma paralela al aumento del estrés oxidativo en las CE (Nagasu y cols., 2016).

4.2 REMODELADO DE LA MATRIZ EXTRACELULAR

Los procesos de remodelado pueden dividirse en fisiológicos (como la vasculogénesis o angiogénesis que ocurren durante el desarrollo embrionario, o el remodelado vascular que tiene lugar durante el embarazo), o en procesos patológicos, que comienzan como una respuesta adaptativa a un cambio pero que, si se cronifican, pueden ser perjudiciales (Langille, 1993). El riñón puede sufrir procesos de remodelado y de reorganización tisular. Las células mesangiales y las CE del glomérulo pueden regenerarse, pero no así los podocitos (Yang y cols., 2014) ni las nefronas, ya que sus células progenitoras se pierden al final de la organogénesis. Por lo tanto, como respuesta a un daño, las nefronas sufren procesos compensatorios de hiperplasia e hipertrofia, pero no aumentan de número (Yang y cols., 2014). Por otro lado, la MEC, que forma parte de la BFG, se encuentra en un proceso continuo de remodelado durante el desarrollo y la maduración tisular (Sachs y Sonnenberg, 2013) o como respuesta a procesos patológicos. Los componentes de la MEC pueden sufrir aumento de su síntesis o de su degradación para regular su composición y estructura, además de para liberar moléculas biológicamente activas como respuesta adaptativa (Bonnans y cols., 2014).

4.2.1 PROTEASAS IMPLICADAS EN EL PROCESO DE REMODELADO DE LA MEC

4.2.1.1 METALOPROTEASAS DE MATRIZ (MMPs)

Las MMPs son una gran familia de endopeptidasas dependientes de zinc, que en su conjunto son capaces de degradar todos los componentes que forman la MEC. Gross y Lapiere las describieron por primera vez en los años 60 y desde entonces el estudio y por lo tanto, el conocimiento de estas enzimas, no ha dejado de crecer (Gross, 2004). Las MMPs se han clasificado tradicionalmente por su estructura, además de por su especificidad por el sustrato como se describe en la siguiente tabla (tabla 5) (Tan y Liu, 2012).

Tabla 5. Clasificación de MMPs según su nomenclatura y la especificidad por sus sustratos. Tabla modificada de (Tan y cols., 2012)

MMP	NOMBRE ALTERNATIVO	SUSTRATO ESPECÍFICO
MMP-1	Colagenasa-1	Colágeno I, II, III, entactina, perlectano, IGF-BP-2 y -3 pro-IL-1 β , IL-1 β
MMP-2	Gelatinasa A	Gelatina, colágeno IV, V, XI, laminina, elastina, aggrecano, pro-TGF- β , pro-TNF- α
MMP-3	Stromelisina-1	Agrecano, laminina, fibronectina, fibrinógeno, MCP-1 a -4, proMMP-1, -3, -7, -8, -9, -13
MMP-7	Matrilisina	Plasminógeno, pro- α -defensina, FasL, pro-TNF- α , E-cadherina, sindecan, pro-MMPs
MMP-8	Colagenasa-2	Colágeno I-III, VII y X, agrecano, fibronectina, pro-TNF- α , IGF-BP, MCP-1 y angiotensina.
MMP-9	Gelatinasa B	Gelatina, colágeno IV, V, XI, pro-IL-8, pro-TNF- α , pro-TNF- β , pro-MMP2, -9, -13
MMP-10	Stromelisina-2	Gelatina, fibronectina, proteoglicanos, pro-MMP-1, -8, -10
MMP-11	Stromelisina-3	Fibronectina, laminina, agrecano, IGF-BP-1,
MMP-12	Metaloelastasa	Elastina, fibronectina, laminina, plasminógeno, pro-TNF- α
MMP-13	Colagenasa-3	Colágeno I, II, III, entactina, agrecano, tenascina, pro-TNF- α , pro-MMP-9, -13
MMP-14	MT1-MMP	Colágeno I, II, III, laminina, fibronectina, pro-MMP-2, -13, CD44, transglutaminasa de tejido
MMP-15	MT2-MMP	Pro-MMP-2, pro-TNF- α , transglutaminasa de tejido
MMP-16	MT3-MMP	Colágeno III, pro-MMP2, pro-TNF- α , transglutaminasa de tejido
MMP-17	MT4-MMP	Gelatina, fibronectina, fibrina, pro-MMP2, ADAMTS-4, TIMPs, pro-TNF- α ,
MMP-18	Colagenasa-4	Colágeno I, II, III
MMP-19	Stromelisina-4	Colágeno IV, gelatina, laminina
MMP-20	Enamelisina	Amelogenina, agrecano,
MMP-21		Gelatina, α -1-antitripsina
MMP-23		Similar a stromelisin y colagenasas
MMP-24	MT5-MMP	Pro-MMP-2
MMP-25	MT6_MMP	Colágeno IV, gelatina, fibrina, fironectina, pro-MMP-2 y -9, TIMPs, uPAR
MMP-26	Matrilisina-2	Colágeno IV, fibronectina, fibrina, fibrinógeno, pro-MMP9
MMP-27		Gelatina, caseína
MMP-28	Epilisina	Molécula de adhesión celular neutra, caseína

Debido la gran variedad de sus sustratos, las MMPs participan en multitud de procesos fisiológicos, como el desarrollo embrionario y la homeostasis de distintos tejidos y en procesos patológicos como tumorogénesis y la fibrogénesis orgánica, jugando un papel muy importante en el control de determinados procesos celulares, como la proliferación, migración, diferenciación, angiogénesis, y apoptosis (Tan y cols., 2012). Aunque la degradación de los componentes que forman la MEC ha sido la función más estudiada de estas proteasas, recientemente se ha demostrado que son capaces de escindir una gran variedad de sustratos como receptores de membrana, moléculas de adhesión, factores de crecimiento y citoquinas (Tocchi y Parks, 2013).

Las MMPs pueden ser secretadas a plasma por numerosos tipos celulares. En el caso de MMP2 y MMP9 se ha descrito su síntesis en fibroblastos, cardiomiocitos, CMLV, CE y células inflamatorias como macrófagos, eosinófilos y neutrófilos (Fontana y cols., 2012). Aunque las MMPs ejercen su acción principalmente a nivel extracelular, se ha descrito la localización de MMPs y de sus inhibidores TIMPs (*Tissue inhibitor of matrix metalloproteinases*) en el núcleo de determinados tipos celulares como cardiomiocitos, neuronas cerebrales, CE, fibroblastos y hepatocitos (Mannello y Medda, 2012). En neuronas, la localización de MMPs a nivel nuclear se ha relacionado con la inactivación de poliADPribosa polimerasa, encargada de reparar el ADN, lo cual favorece la acumulación de ADN oxidado disparando los procesos de muerte neuronal (Yang y cols., 2010). Algunas MMPs como MMP-1, MMP-2 y MMP-11 pueden actuar también sobre proteínas intracelulares (Tan y cols., 2012).

- **Estructura de las MMPs**

Las MMPs, a pesar de formar una gran familia de proteasas, presentan una estructura muy similar entre sí. Todas ellas contienen un péptido de señalización que permite su liberación de la célula al espacio extracelular. Las MMPs se sintetizan como proenzimas (pro-MMPs), es decir, presentan un dominio pro, rico en residuos de cisteína, que cubre el dominio catalítico manteniendo inactiva a la MMP. El centro activo contiene un átomo de zinc (Zn^{2+}) coordinado con tres residuos de histidina. En la proenzima el átomo de Zn^{2+} está unido a un residuo de cisteína del propéptido mediante lo que se conoce como puente de cisteína. Esta unión permite que la enzima se mantenga en la forma latente, al impedir la interacción de una molécula de agua con el catión metálico, necesaria para que las MMPs lleven a cabo su actividad hidrolítica (Yamamoto y cols., 2015). En el caso de las gelatinasas MMP2 y MMP9, el dominio catalítico contiene 3 repeticiones de fibronectina que le dan el nombre de dominio tipo fibronectina. Es en el dominio catalítico donde se encuentra el dominio de unión a colágeno (Mannetto y cols., 2012). Las MMPs, contienen también un dominio de tipo hemopexina que está separado del dominio catalítico por una región bisagra. La especificidad por el sustrato y por sus inhibidores viene dada por la estructura del dominio catalítico y del dominio tipo hemopexina. Sin embargo, en el caso de las gelatinasas el dominio tipo hemopexina no juega un papel importante en el reconocimiento del sustrato, dejando esta función al dominio catalítico (DSbardell y cols., 2012).

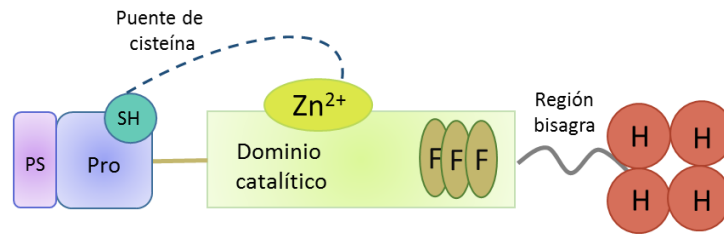


Figura 8. Modelo representativo de la estructura de una gelatinasa. De izquierda a derecha, péptido señal, prodominio, dominio catalítico en el cual están contenidas las tres repeticiones de fibronectina, región bisagra y dominio tipo hemopexina.

• Regulación de las MMPs

Las MMPs están sometidas a una regulación muy estrecha, que puede llevarse a cabo a varios niveles. Se han identificado regiones promotoras en los genes que codifican para las MMPs (Chase y Newby, 2003), lo cual permite la regulación de la transcripción de estas proteasas por moléculas como citoquinas inflamatorias, factores de crecimiento u hormonas (Nagase y cols., 2006). Otras moléculas como la Ang II o las EROs pueden activar factores transcripcionales como el activador de la proteína 1 (AP-1), STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) y NF- κ B (*Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cell*), aumentando la expresión de MMP2 y MMP9 (Deschamps y cols., 2006). Se ha descrito que un aumento en la presión hidrostática en las arterias puede producir una activación de NADPH oxidasa que aumenta la expresión de ARNm (ácido ribonucleico mensajero) de MMP2 (Grote y cols., 2003; Iyer y cols., 2005).

Las MMPs se sintetizan como zimógenos inactivos, por lo tanto, su activación requiere la proteólisis del propéptido por la acción de otras proteasas como tripsina, plasmina, u otras MMPs (Baricos y cols., 1995). Sin embargo, se han descrito otras formas de activación de las pro-MMPs sin la necesidad de escindir el propéptido que las mantiene inactivas. Un aumento de los niveles de EROs puede producir la oxidación de los grupos tiol que forman el puente de cisteína que cierra el centro activo de la enzima a través de procesos de S-glutathionilación o S-nitrosilación como se muestra en la figura 9. Esta oxidación rompe el puente de cisteína, permitiendo, de esta manera, la activación de la enzima (Rajagopalan y cols., 1996). Inoue y cols. describieron que las EROs derivadas de la NADPH oxidasa, también pueden producir un aumento de la síntesis de MMP2 en cultivo de CE de aorta (Inoue y cols., 2001). Aunque, por el contrario, una exposición prolongada a las EROs, puede producir la oxidación de otros residuos, haciendo que la proteasas pierda de esta manera su actividad catalítica (Fu y cols., 2004).

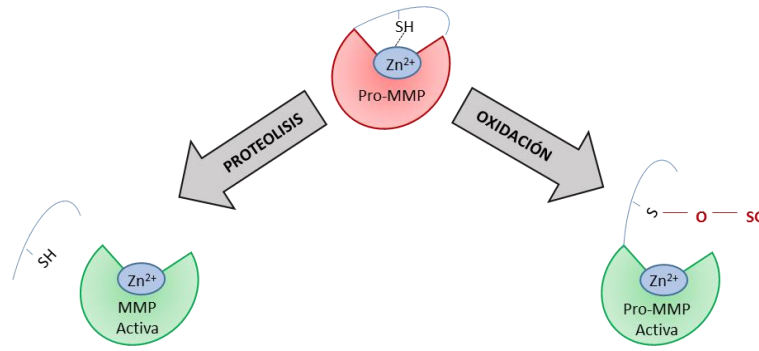


Figura 9. Activación mediante proteólisis o mediante oxidación de las MMPs. Modificado de Chow y cols., 2007.

Determinados componentes de la MEC como glucosaminoglicanos y moléculas de la superficie celular pueden activar a las MMPs. La unión de estas moléculas a determinados sitios alostéricos de la estructura de las pro-MMPs puede generar cambios conformacionales que rompen el puente de cisteína que mantiene inactivas a las proteasas (Tocchi y Parks, 2013). Por ejemplo, la elastina insoluble y el colágeno tipo IV son capaces de unirse al dominio de fibronectina tipo II de pro-MMP2 y de pro-MMP9 y activarlas. Además de favorecer su activación, la unión de las MMPs a determinadas proteínas extracelulares, como por ejemplo a la heparina, permite su solubilización (Yamamoto y cols., 2015). Por último, la actividad de las MMPs se encuentra estrechamente regulada por sus inhibidores endógenos TIMPs como se verá en el punto 4.2.2.

- **Metaloproteasa de Matriz 2 o Gelatinasa A**

Esta proteasa se expresa de manera constitutiva en casi todo los tejidos y su actividad está relacionada con funciones homeostáticas, como el remodelado tisular, la angiogénesis (Sbardella y cols., 2012), aunque su expresión también puede aumentarse en procesos de hipoxia, como respuesta a Ang II o citoquinas proinflamatorias (Chow y cols., 2007). La MMP2 se genera como zimógeno inactivo con un peso molecular de 72 KDa. Se activa a través de la proteólisis del propéptido, quedando de esta manera la forma activa de la enzima con un peso molecular de 62 KDa. La apertura del centro activo de la enzima puede producirse también por la acción de oxidantes mediante la S-glutationilación o por la S-nitrosilación del residuo de cisteína que forma un puente sulfuro con el átomo de Zn^{2+} contenido en el centro activo de la MMP2, quedando de esta manera la MMP2 activa pero con un peso molecular de 72 KDa.

Se ha descrito recientemente que la MMP2 puede tener también actividad a nivel intracelular. En este contexto, se ha identificado una variante de MMP2 a la que le faltan los 50 primeros aminoácidos que contienen el péptido señal que permite su salida de la célula,

con lo cual, sólo se puede encontrar en el citosol celular. Además de esta variante, se ha descrito una tercera forma de MMP2, cuya expresión se induce por estrés oxidativo y que no se encuentra en condiciones basales, a la que le falta el prodominio inhibitorio y la secuencia secretora, lo cual indica que sólo se puede encontrar en el citosol y en la mitocondria (Jacob-Ferreira y Schulz, 2013). Finalmente, MMP2 es una proteína con 29 posibles sitios de fosforilación. Se ha demostrado que la defosforilación de esta proteína produce un cambio conformacional que deja al descubierto el centro activo, sin necesidad de hidrolizar el propéptido, aumentando su actividad en mayor medida incluso, que mediante la oxidación del puente de cisteína (Jacob-Ferreira y cols., 2013*).

- **Metaloproteasa de Matriz 9 o Gelatinasa B.**

La MMP9 es una proteasa inducible, que se genera principalmente en procesos patológicos. Se sintetiza en un menor número de tipos celulares que la MMP2, principalmente en células del sistema inmune, entre ellas, neutrófilos, monocitos/macrófagos, aunque también se sintetiza en fibroblastos cardíacos, CMLV, CE, podocitos renales, etc. (Sbardella y cols., 2012; Yabluchanskiy y cols., 2013; Li y cols., 2014). La MMP9 comparte la estructura general de las MMPs, pero además contiene un dominio de O-glicosilación que conecta el centro activo con el dominio tipo hemopexina. Hay varios estudios que indican que este dominio es indispensable para el correcto funcionamiento de la MMP9. Durante el proceso de síntesis de MMP9 este dominio juega un papel importante, ya que permite la glicosilación de la proteasa en el retículo endoplásmico dando lugar a la MMP9 glicosilada de 85 o 89 KDa, que más tarde en el aparato de Golgi se generará la pro-MMP9 de 92 KDa. La proteólisis del propéptido da lugar a la MMP9 activa de 82KDa (Vandooren y cols., 2013).

Dentro de los procesos fisiológicos, la MMP9 participa en la ovulación, en el crecimiento y en el desarrollo, en la migración celular y el mantenimiento celular, e incluso en procesos como el aprendizaje y la memoria. Sin embargo, la MMP9 es una proteasa principalmente inducible en situaciones patológicas, y aunque la regulación de su actividad se puede realizar a distintos niveles, la más importante es la regulación a nivel de transcripción (Li y cols., 2014). Su expresión se puede ver regulada al alza en procesos patológicos como enfermedades inflamatorias, diabetes, enfermedades de la piel, cáncer, desórdenes neurológicos y enfermedades CV como hipertensión, aterosclerosis o infarto de miocardio entre otras (Yabluchanskiy y cols., 2013; Vandooren y cols., 2013). Un aumento de EROs así como la acción de citoquinas, factores de crecimiento u hormonas pueden regular la transcripción del gen que codifica para esta proteasa (Shinohara y cols., 2010). Otro nivel de regulación de la actividad

de la MMP9 es su liberación al medio extracelular. Esta proteasa una vez sintetizada se almacena en forma de zimógeno en vesículas contenidas en el citoplasma, que se liberarán como respuesta a un estímulo de daño (Vandooren y cols., 2013).

4.2.1.2 OTRAS PROTEASAS DE MATRIZ EXTRACELULAR

- ***Adamalisinas***

Esta familia está formada a su vez por dos subfamilias, los ADAMs (*A Disintegrin And Metalloproteinase*; formada por desintegrinas y metaloproteinasas) y los ADAMTs (*A Disintegrin And Metalloprotease with Thrombospondin motifs*), que son moléculas similares a los ADAMs, pero con la diferencia de que presentan un motivo de trombospodina en su estructura. Los ADAMs se encargan de escindir los exodominios de proteínas transmembrana como citoquinas, factores de crecimiento, receptores y moléculas de adhesión (Bonnans y cols., 2014). Las proteasas de la subfamilia de los ADAMTs se encargan de procesar moléculas de pro-colágeno I, II y III jugando un papel activo en el depósito fisiológico de fibras de colágeno en la MEC de manera específica para cada tejido (Bonnans y cols., 2014).

- ***Meprinas***

Estas proteasas pertenecen a la familia de las Astacinas, están compuestas por dos subunidades (α y β), codificadas en genes diferentes. Son capaces de activar otras proteasas como pro-MMP9 y de degradar colágeno tipo IV, nidógeno y fibronectina. Actúan en el proceso de maduración del colágeno, ya que pueden hidrolizar la molécula de pro-colágeno I (Bonnans y cols., 2014).

- ***Serín proteasas***

Serín proteasas también tienen como diana de acción la MEC, dentro de esta familia se encuentra la elastasa que se libera de neutrófilos y se encarga de la degradación de fibronectina y elastina, produciendo desmosina como metabolito de la degradación de elastina (Bonnans y cols., 2014).

- ***Heparanasas y sulfatasas***

Heparanasas y sulfatasas actúan sobre los peptidoglicanos de la MEC. La activación de estas proteasas resulta en alteraciones de la MEC y en la liberación de fragmentos sacarídicos bioactivos, de factores de crecimiento y citoquinas que se encontraban unidos a los residuos de heparán sulfato (Bonnans y cols., 2014). Se ha descrito que uno de los factores capaces de aumentar la expresión de heparanasa es aumento de estrés oxidativo (Kuwabara y cols., 2010).

4.2.2 INHIBIDORES ENDÓGENOS DE MMPs

4.2.2.1 INHIBIDORES TISULARES DE METALOPROTEASAS DE MATRIZ

La actividad de las MMPs se encuentra estrechamente regulada por los inhibidores tisulares de MMPs, los TIMPs. Se conocen 4 tipos de TIMPs que presentan una estructura química muy similar entre ellos. Son moléculas que se unen estequiométricamente en una proporción 1:1 a las MMPs. Todos los TIMPs son capaces de inhibir a todas las MMPs, aunque existe cierta especificidad, por ejemplo, TIMP2 se une con más afinidad a MMP2 y TIMP1 a MMP9 (Murphy, 2011).

Los TIMPs inactivan a las MMPs formando un puente entre uno de sus residuos de cisteína y el átomo de Zn^{2+} contenido en el centro activo de la enzima. El grupo tiol de este residuo de cisteína es susceptible de oxidarse, lo que conlleva la inactivación de la capacidad inhibitoria de esta molécula, que se traduce en un aumento de la actividad de las MMPs (Wang y cols., 2007). También son capaces de unirse al dominio de hemopexina de los zimógenos pro-MMP2 y pro-MMP9, formando un complejo estable, que deja libre el dominio N-terminal del TIMP, permitiéndole a su vez, actuar como inhibidor de otras MMPs (Murphy, 2011).

Aunque su acción principal es la de inhibir a las MMPs, se sabe que pueden actuar directamente sobre distintas vías de señalización implicadas en la regulación del crecimiento y apoptosis, o utilizarse como marcadores de la evolución de distintos tipos de cáncer (Murphy, 2011). Los TIMPs protegen la MEC de la degradación en tejidos sanos, y tras procesos patológicos controlan el depósito de MEC en los tejidos dañados. En los últimos tiempos se ha puesto en evidencia que el balance entre las MMPs y los TIMPs controla muchos más procesos a parte de la tradicional degradación de la MEC (Arpino y cols., 2015).

• TIMP-1

Tiene selectividad principalmente por MMP9. Está descrito que la expresión de TIMP1 aumenta en ambientes profibróticos, lo cual indica la implicación de TIMP1 en la disminución de la proteólisis de la MEC (Arpino y cols., 2015) y de la inflamación producida tras un daño (Kin y cols., 2005; Wang y cols., 2011).

• TIMP-2

Aunque este TIMP es capaz de inhibir un gran número de MMPs, tiene mayor selectividad por MMP2. La expresión de TIMP2 es constitutiva y coincide con los patrones de expresión de MMP2 (Donnelly y cols., 2003). A pesar de que su acción más conocida es la de inhibir a las MMPs, también se ha demostrado que a bajas concentraciones TIMP2 puede participar en la

activación de MMP2 en presencia de MT1-MMP (*Membrane Type-1 Metalloprotease*) (Caterina y cols., 2000; Nagase y cols., 2006). En este contexto, Wang y cols. sugieren, que la presencia de TIMP2 favorece el desarrollo de fibrosis tubulointersticial mediante la activación de MMP2 (Wang y cols., 2014).

4.2.2.2 α 2-MACROGLOBULINA

Otro inhibidor de las MMPs es la proteína α 2-macroglobulina. Esta es una glicoproteína plasmática de 725 KDa, formada por 4 subunidades idénticas de 180KDa. Las MMPs (tanto en su forma activa como de zimógeno) forman un complejo con la macroglobulina que puede sufrir un proceso de endocitosis mediado por el receptor de α 2-macroglobulina (Tan y cols., 2012).

4.2.3 CONTRIBUCIÓN DE LAS MMPs EN LA PATOLOGÍA RENAL

Se han demostrado los efectos beneficiosos del aumento de la actividad de las MMPs en procesos patológicos como el daño renal agudo, en el que un aumento de la actividad de las MMPs es beneficioso para el proceso de recuperación tisular tras el daño (Kaneko y cols., 2012). Sin embargo, un desequilibrio en la actividad de estas proteasas puede tener efectos perjudiciales, ya sea por una disminución de la actividad o la expresión de MMPs, que se ha relacionado con procesos profibróticos a nivel renal, como por un aumento de su actividad de forma no controlada, produciendo una degradación excesiva de la MEC (Tsai y cols., 2012). En este contexto, se ha descrito una correlación entre la actividad urinaria de MMP9 y la enfermedad renal diabética, encontrándose niveles elevados de esta proteasa en los estadios iniciales de la enfermedad renal crónica, incluso antes de que aparezca albuminuria (Altemtam y cols., 2012). En plasma de pacientes con diabetes tipo 1, que además presentan valores elevados de albúmina en orina, se ha observado un aumento de los niveles de MMP2 en comparación con los que presentan normoalbuminuria (Peeters y cols., 2015). Además de estos resultados obtenidos en pacientes, en un modelo animal de diabetes mellitus, Li y cols., han demostrado que un aumento de la actividad de MMP9, está implicada en los procesos de engrosamiento de la MEC glomerular, de hiperfiltración glomerular y aparición de albuminuria, probablemente debido a la degradación de los componentes que forman la MEC glomerular. En este estudio y en otros realizados en ratones con diabetes mellitus tipo 1 se observó además, que aparecen elevadas concentraciones de MMP9 (Li y cols., 2014) y mayor actividad de MMP9 y MMP2 (McKittick y cols., 2011) en orina antes de que se instaurase la albuminuria. En otro modelo experimental de albuminuria inducida por adriamicina, se asoció un aumento

de la actividad de MMP9 con el desarrollo de albuminuria, es más, la delección de MMP9 mejoró el daño glomerular (Sakamaki y cols., 2010). Además se ha observado una asociación entre la concentración plasmática de MMP9 y la detección en orina de podocitos en pacientes diabéticos (Nakamura y cols., 2000). Por consiguiente, se ha propuesto que este aumento de la actividad de MMPs es un indicador del establecimiento de alteraciones en el remodelado de la MEC del glomérulo y el túbulo en estadios tempranos de insuficiencia renal diabética (Thraikill y cols., 2010; Altemtam y cols., 2012).

Un aumento en la expresión y la activación de MMP9 está relacionado con procesos de inflamación, estrés oxidativo y la activación del SRA, todos ellos factores que se dan en hipertensión (Marchesi y cols., 2012) y que como se ha descrito anteriormente, están asociados con la aparición de la albuminuria. Por otro lado, las MMPs tienen más sustratos a parte de la MEC, por ejemplo MMP2 es capaz de degradar la molécula de ET-1 generando un péptido de menor tamaño, pero con un efecto vasoconstrictor mucho más potente (Fernández Patrón y cols., 1999). También se ha descrito que las MMPs son capaces de proteolizar el dominio extracelular del receptor β 2-adrenérgico, suprimiendo su efecto vasodilatador (Wu y Schmid-Schönbein, 2011; Wang y cols., 2015*). Todo esto favorece la vasoconstricción de los vasos sanguíneos glomerulares, aumentando la presión intraglomerular y favoreciendo la filtración de la albúmina desde el torrente sanguíneo a la orina.

4.2.4 PAPEL DE LAS MMPs EN EL REMODELADO ARTERIAL

Los vasos sanguíneos y en especial las arterias, están sometidos continuamente a fuerzas mecánicas cambiantes que requieren su adaptación. Esta adaptación supone una reorganización estructural que se lleva a cabo principalmente por acción de las MMPs (Langille, 1993). Sin embargo, un aumento en la activación de las mismas puede tener como consecuencia el aumento de la degradación de colágeno, que produce la desestructuración de la MEC, permitiendo la liberación de las CMLV, lo cual favorece la proliferación y migración celular, contribuyendo al engrosamiento de la pared de los vasos sanguíneos (Wang y cols., 2015). En este contexto, se ha observado que MMP2 contribuye al aumento de la permeabilidad vascular. La exposición de las CE a MMP2 disminuye la producción de NO a través de la interacción con la eNOS, lo cual favorece la disminución de la vasodilatación (Nagareddi y cols., 2012). Se ha propuesto que un aumento del estrés oxidativo produce una mayor activación de MMPs y con el tiempo un aumento de su expresión, acelerando el proceso de remodelado (Ceron y cols., 2012). Patologías en las que se encuentran aumentados los procesos de estrés y la respuesta inflamatoria y una sobre activación de SRA pueden

favorecer el desarrollo de rigidez arterial a través de la acción de las MMPs (McEniery y cols., 2005).

El aumento de la expresión de las MMPs está implicada en el remodelado hipertrófico vascular asociado a la hipertensión, tanto en pacientes como en modelos animales. Pero del conjunto de MMPs, MMP2 y MMP9 son las mayores contribuyentes a la disfunción CV mediada por la hipertensión y las alteraciones estructurales (Castro y Tanus-Santos, 2013). La degradación excesiva de la elastina arterial por parte tanto de MMP2 como de MMP9 (Basalyga y cols., 2004) y la consiguiente síntesis de colágeno compensatoria favorecen la rigidez arterial y la fibrosis. De hecho, un aumento de la actividad plasmática de MMP9 correlaciona positivamente con la VOP en hipertensión (McEniery y cols., 2005). Incluso en individuos sanos, jóvenes y normotensos, los niveles de MMP9 son predictores independientes de rigidez arterial (Lakatta y Levy, 2003; Yasmin y cols., 2005). Por otro lado, se han identificado diferentes polimorfismos en el gen que codifica para MMP9, que se traducen en un aumento de la rigidez arterial e hipertensión (Yabluchanskiy y cols., 2013).

4.3 MICROPARTÍCULAS

La primera vez que se demostró la participación de las micropartículas en una enfermedad fue en la *púrpura trombótica trombocitopénica idiopática* (Chironi y cols., 2009). Desde entonces ha aumentado el interés en el estudio de las micropartículas, no solo como marcadores pronósticos en distintas enfermedades, sino también como agentes biológicos y potenciales dianas terapéuticas.

4.3.1 FORMACIÓN DE MICROPARTÍCULAS

La membrana celular en reposo presenta una distribución de fosfolípidos caracterizada por la presencia de fosfatidilcolina y esfingomielina en la capa externa y fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina en la capa interna. Durante procesos como la activación celular o la apoptosis se produce un aumento de la liberación intracelular de calcio por parte del retículo endoplásmico, lo cual provoca la externalización de la fosfatidilserina y la reorganización del citoesqueleto, que dará lugar a la formación y liberación de las micropartículas al medio extracelular (Chironi y cols., 2009). Por lo tanto, las micropartículas son fragmentos de membrana citoplasmática que pueden derivar de todos los tipos celulares y presentan un diámetro comprendido entre 0,1 y 1 μm . No contienen núcleo, pero sí expresan proteínas de membrana y en su interior contienen material citoplasmático procedente de la célula de origen. Por consiguiente, pueden almacenar proteínas en su interior e influir en la señalización

celular. Son detectables en individuos sanos, aunque dado que se liberan al medio extracelular por estímulos de daño o estrés, su número aparece aumentado en condiciones patológicas (Chironi y cols., 2009).

4.3.2 PAPEL FISIOPATOLÓGICO DE LAS MICROPARTÍCULAS

Dado que las micropartículas pueden contener distintas moléculas en su interior, y por lo tanto liberarlas, pueden jugar un papel importante en procesos patológicos como la albuminuria y el estrés oxidativo, teniendo gran importancia en enfermedades CV y renales, al igual que en desórdenes metabólicos como obesidad, dislipemia o diabetes. En concordancia, se sabe que estas enfermedades cursan con un número elevado de micropartículas circulantes derivadas de plaquetas, monocitos o CE (George, 2008; Berezin y cols., 2015).

Dentro del grupo de micropartículas, posiblemente las más estudiadas sean las derivadas de CE. Éstas se consideran una importante fuente de información del estado en el que se encuentran las CE y por consiguiente, la función vascular (Berezin y cols., 2015). El daño generado en las CE, entre otros factores por un aumento de estrés oxidativo, se correlaciona con un aumento de la liberación de micropartículas a la corriente sanguínea. Además, son indicadores indirectos de inflamación endotelial, de aumento de la coagulación o del tono vascular (Berezin y cols., 2015). El aumento del número de las micropartículas procedentes de CE está asociado con cambios estructurales y funcionales como el aumento en la VOP, pudiendo observarse este aumento incluso en hipertensión moderada (Shantisila y cols., 2010). En los últimos tiempos están creciendo las evidencias de que las micropartículas derivadas de CE pueden tener un valor predictivo de pronóstico adverso en hipertensión pulmonar o en enfermedad renal crónica (Anderson y cols., 2010; Burger y Touyz, 2012).

Se ha descrito que las micropartículas derivadas de CE pueden contener en su interior material genético como ARNm, microARN (macromoléculas de ARN endógeno de 21-25 nucleótidos), que pueden transferir a otras células (Wahid y cols., 2010). También pueden almacenar en su interior citoquinas, enzimas como NADPH oxidasa o proteasas como MMP2 o MMP9 tanto en su forma activa como en forma de proenzima, ejerciendo así un papel activo en procesos como la coagulación, inflamación, angiogénesis o adhesión leucocitaria (Berezin y cols., 2015). Souza y cols. demostraron que las micropartículas tenían efecto *per se* (Souza y cols., 2015). En concordancia, existen evidencias de que las micropartículas por sí mismas pueden ejercer un efecto deletéreo sobre el endotelio. Se ha demostrado recientemente que las micropartículas procedentes de CE están asociadas con un aumento del estrés oxidativo y la expresión de proteínas de adhesión celular en cultivos de CE. En condiciones de

hiperglicemia se ha descrito que este aumento de las micropartículas generadas a partir de CE contribuye al desarrollo de inflamación vascular y al empeoramiento de la función endotelial (Jansen y cols., 2013). De la misma manera, se ha demostrado que las micropartículas derivadas de placas ateroscleróticas humanas favorecen la adhesión de monocitos y su migración transendotelial y que las micropartículas derivadas de ratas con hipertensión pulmonar inhiben la producción de NO endotelial y por lo tanto, comprometen la relajación dependiente de endotelio (Shantisila y cols., 2010).

Otra fuente importante de micropartículas a nivel plasmático son las plaquetas. Se considera que la superficie de estas micropartículas, tiene entre 50 y 100 veces más actividad procoagulante que la superficie de las plaquetas activadas *per se* (Shantisila y cols., 2010).

4.3.3 MICROPARTÍCULAS EN LA ENFERMEDAD RENAL

Se ha descrito que la liberación de micropartículas está aumentada en la enfermedad renal crónica, de manera que el número de micropartículas circulantes correlaciona directamente con la severidad de la enfermedad renal. En esta situación, las toxinas urémicas y el aumento de la rigidez arterial contribuyen a la apoptosis de las CE, lo cual produce un aumento de las micropartículas derivadas de CE (Anderson y cols., 2010). Además, en un modelo animal de nefropatía diabética, se ha observado que la aparición de micropartículas derivadas de podocitos en la orina es un marcador temprano de daño glomerular (Burger y cols., 2014).

4.3.4 MICROPARTÍCULAS Y MMPs

Taraboletti y cols., han demostrado que las vesículas procedentes de CE contienen MMP2 y MMP9, tanto en su forma activa como en su forma de proenzima. Esto indica que en el citosol de las CE existen acúmulos de MMP2 y MMP9 activas, confirmando que se almacenan para ser liberadas al medio extracelular inmediatamente tras el estímulo (Taraboletti y cols., 2002). También se ha observado que estas vesículas contienen los inhibidores TIMP1 y TIMP2 acompañando a las MMPs (Mannello y Medda, 2012).

5 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO COMO ESTRATEGIA TERAPÉUTICA CONTRA LA ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR Y RENAL

El control de las enfermedades CV y renales se inicia desde un cambio del estilo de vida, disminuyendo la ingesta de sal y de grasas, disminuyendo el peso corporal y con el abandono

del hábito de fumar. También requiere un control del perfil lipídico con estatinas o fibratos y el tratamiento de la resistencia a la insulina con el uso de antidiabéticos orales. Por último y no menos importante, el estricto control de la presión arterial (Segura y Ruilope, 2005).

5.1 FÁRMACOS ANTIHIPERTENSIVOS BLOQUEANTES DEL SRA

El tratamiento farmacológico más utilizado para el control de la hipertensión arterial se basa en el bloqueo del SRA con inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (iECA) o con antagonistas del receptor de angiotensina II (ARA II) como se detalla en la siguiente figura (figura 10).

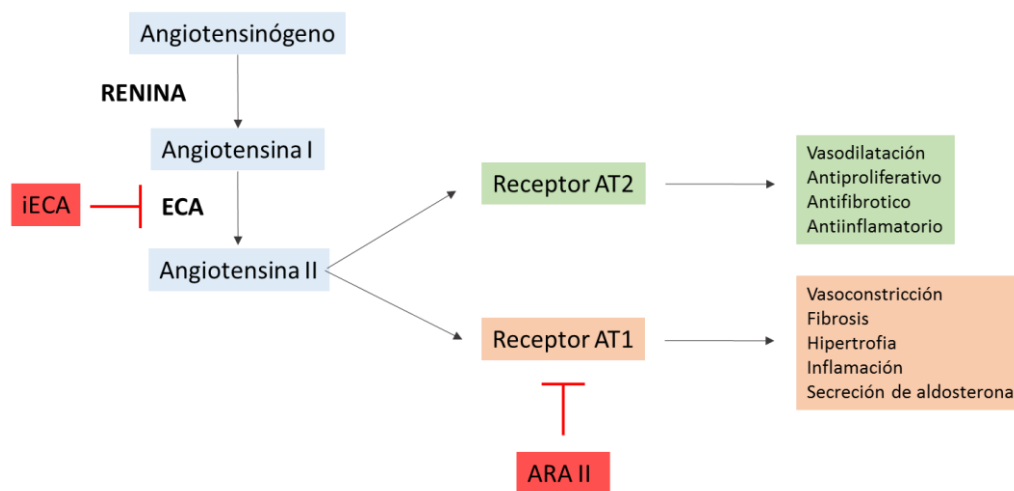


Figura 10. Esquema del SRA y sus principales inhibidores usados en clínica. ECA, Enzima Convertidora de Angiotensina; iECA, inhibidor de la ECA; ARA II, Antagonista del Receptor Angiotensina II.

Son numerosos los estudios que demuestran que estos fármacos además de reducir la presión arterial, son capaces de disminuir la excreción urinaria de albúmina (ESH, ESC; 2013; Rojas-Rivera y cols., 2012) ya que corrigen el desajuste hemodinámico (Futrakul y cols., 2009; Cerasola y cols., 2010) y disminuyen la respuesta inflamatoria (Oberg y cols., 2004). Existen estudios que sugieren que la disminución de la albuminuria con inhibidores del SRA se consigue de forma más efectiva a dosis superiores a las utilizadas para disminuir la presión arterial (Hou y cols., 2007).

En el estudio PREVENT IT (*Prevention of Renal and Vascular End stage Disease Intervention Trial*) se observó que el tratamiento con fosinopril disminuyó la albuminuria en un 26%. Esta disminución se asoció con una reducción del 90% en los eventos cerebrovasculares (Asselbergs y cols., 2004). Otros estudios realizados tanto con iECAs como con ARA II en pacientes,

muestran una disminución de la progresión de la enfermedad renal y de los eventos CV en pacientes con enfermedad renal (Brenner y cols., 2001) asociada a una disminución de la presión sanguínea junto con una disminución de la excreción urinaria de proteínas (Maschio y cols., 1996). Se ha descrito en estudios como el LIFE, que la disminución de la albuminuria en pacientes hipertensos se traduce en una disminución de los eventos CV (Ibsen y cols., 2005). Sin embargo, una disminución excesiva de la presión sanguínea, como se concluyó en el estudio ACCORD (*Action to Control Cardiovascular Risk in Diabetes*) por debajo de 120 mmHg, en pacientes con diabetes mellitus, puede contrarrestar el beneficio de la disminución de la albuminuria con respecto a la aparición de enfermedades CV (Cushman y cols., 2010). Algunos ensayos clínicos estudiaron el posible beneficio del uso conjunto de un iECA y un ARAII en pacientes con albuminuria y un elevado riesgo CV, como el estudio IMPROVE (*Irbesartan in the Management of PROteinuric patients at high risk for Vascular Events*), sin embargo, no se obtuvieron beneficios sobre la reducción de la albuminuria con el doble bloqueo del SRA en comparación con el uso de un solo fármaco (Bakris y cols., 2007). Esto mismo se observó en posteriores metaanálisis y ensayos clínicos como el estudio ONTARGET (ONgoing Telmisartan Alone and in combination with Ramipril Global Endpoint Trial) y TRANSCEND (Telmisartan Randomized Assessment Study in ACE Intolerant Subjects with Cardiovascular Disease) (para revisión Viazzi y cols., 2016).

Muchos de los efectos de la señalización de Ang II en los tejidos diana, están mediados por un aumento en la producción de EROs, a través de la activación de las NAD(P)H oxidasas (Griendling y cols., 1994; Wingler y cols., 2001) y el desacoplamiento de la eNOS. Uno de los mecanismos por el cual el bloqueo del SRA protege al riñón en patologías como la diabetes, es mediante la inhibición del efecto directo y deletéreo de la Ang II sobre los podocitos, a través de una disminución de la inflamación y del estrés oxidativo producido por el aumento de EROs mediada por NADPH oxidasa y la eNOS desacoplada (Satoh, 2012; Sato-Horiguchi y cols., 2012; Zhou y cols., 2014). También disminuyen la acumulación de MEC y la evolución de la glomerulosclerosis (Benigni y cols., 2011).

5.1.1 ALBUMINURIA RESISTENTE AL BLOQUEO DEL SRA

A pesar de todas estas evidencias en la literatura, se ha descrito la aparición de albuminuria en pacientes diabéticos e hipertensos que se encontraban bajo bloqueo del sistema SRA en dos ensayos clínicos como son el estudio BENEDICT (BErgamo NEphrologic Diabetes Complications Trial) (Ruggenenti y cols., 2004) y ROADMAP (The Randomized Olmesartan and Diabetes Microalbuminuria Prevention) (Haller y cols., 2011), en los cuales el bloqueo del SRA

no impedía el desarrollo de albuminuria, pero sí lo retardaba. Otro estudio realizado por Cerezo y cols., en pacientes hipertensos en el cual se incluyó a un bajo porcentaje de diabéticos, se observó que el 16.1% de los pacientes llegaron a desarrollar albuminuria moderada y el 1% albuminuria severa, a pesar del bloqueo del SRA. Aunque el desarrollo de albuminuria durante el tratamiento se observó a cualquier valor de presión arterial sistólica, desde 130 mmHg, hasta valores de 160 mmHg, los pacientes que desarrollaron albuminuria presentaron un peor control de la presión arterial, necesitando un mayor número de fármacos, que aquellos que presentaron durante todo el estudio valores normales de albuminuria. Esta albuminuria así desarrollada, tiene mayor prevalencia en los pacientes con enfermedad CV establecida. Además, está asociada con un mayor riesgo de desarrollar nuevos eventos CV, lo cual indica que la albuminuria desarrollada pese al bloqueo del SRA sigue siendo un buen predictor de morbilidad y mortalidad CV (Cerezo y cols., 2012). En este contexto, se ha descrito una asociación independiente entre los niveles de rigidez arterial y un aumento severo de la albuminuria en pacientes hipertensos, no diabéticos en estadio 1-2 de enfermedad renal pese a estar tratados con bloqueantes del SRA (Kalaitzidis y cols., 2015).

Recientemente, se ha descrito la implicación de la modificación de los valores de dos proteínas en la predicción de la evolución de la albuminuria en estos pacientes con albuminuria resistente al bloqueo del SRA. Se ha observado que una disminución de CD59 (que es una proteína que protege a la célula en una situación de inflamación) y un aumento de AAT (Alpha-1 antitripsina; que es una proteína plasmática sensible a la inflamación), predicen la progresión de la albuminuria en pacientes con bloqueo de SRA (González-Calero y cols., 2016).

Finalmente, se ha observado que en los pacientes hipertensos controlados con bloqueantes del SRA, el desarrollo de la albuminuria resistente o escape de albuminuria se asocia a un aumento del estrés oxidativo que se acompaña por un aumento de la capacidad antioxidante total. Sin embargo, la capacidad antioxidante de estos pacientes no es capaz de contrarrestar este aumento del estrés oxidativo (Ruiz-Hurtado y cols., 2014). Estos resultados y otros publicados previamente sugieren que no es sólo la cantidad de antioxidantes, sino la relación entre los niveles de oxidantes y antioxidantes lo que indica el estatus oxidativo en el que se encuentra el paciente (Piarulli y cols., 2009). En este contexto, existen numerosos estudios en la literatura que proponen a la vitamina D como nueva estrategia terapéutica antioxidante.

5.2 VITAMINA D COMO NUEVA ESTRATEGIA TERAPÉUTICA

5.2.1 DÉFICIT DE VITAMINA D

Estudios demográficos apuntan a una hipovitaminosis D a nivel mundial, que llega al 50% en los países occidentales (Lips, 2010), debida al envejecimiento de la población, al estilo de vida y a causas medioambientales (contaminación), que disminuyen la exposición a la luz solar, necesaria para la síntesis de vitamina D en la piel (Holick, 2004; Richart y cols., 2007). Aunque existe mucha controversia acerca de los valores de vitamina D que se consideran como deficiencia, insuficiencia y los que se consideran valores normales, la mayoría de los expertos definen la deficiencia de vitamina D como los niveles de 25-hidroxicolecalciferol menores de 20 ng/mL y como insuficiencia valores comprendidos en el intervalo de 21-29 ng/mL (Lee y cols., 2008).

Clásicamente la deficiencia de vitamina D se ha asociado con raquitismos en niños y osteomalacia en adultos (Lee y cols., 2008). Pero debido a la amplia localización del receptor de vitamina D (VDR), un déficit de vitamina D se asocia con numerosos estados patológicos (Holick, 2004). Recientemente se ha descrito que una deficiencia en vitamina D es un factor de riesgo independiente de mortalidad en la población general, y una suplementación con vitamina D está asociada con una disminución significativa de la misma (Pilz y cols., 2009; Krivošíková y cols., 2015). Son numerosos los estudios epidemiológicos que describen un aumento de riesgo de sufrir una enfermedad CV y renal asociado a una disminución de la concentración plasmática de 25-hidroxicolecalciferol, de hecho, se ha descrito un aumento de los eventos CV en invierno y a medida que se incrementa la distancia con el ecuador, debido a la disminución de las horas de luz (Drechsler y cols., 2010; Normal y Powell, 2014). La deficiencia de vitamina D predispone a hipertensión (Burgaz y cols., 2011; Normal y Powell, 2014), diabetes, síndrome metabólico (Lee y cols., 2008), hipertrofia de ventrículo izquierdo, insuficiencia cardiaca congestiva, inflamación vascular crónica (Lee y cols., 2008; Rojas-Rivera y cols., 2010; Tuñón y cols., 2014), cáncer de colon, artritis reumatoide, esclerosis múltiple o enfermedad de Crohn (Holick, 2004).

5.2.2 DÉFICIT DE VITAMINA D Y ENFERMEDAD RENAL

En enfermedad crónica renal la prevalencia de deficiencia de vitamina D es muy alta y en algunos estudios se estima del 70-80% (Molina y cols., 2014). Los niveles de calcitriol (metabolito activo de la vitamina D) disminuyen en estadios tempranos de insuficiencia renal crónica, incluso antes que el calcio y fósforo sérico y la hormona paratiroidea (PTH) (Rojas-

Rivera y cols., 2010). Además, en esta población la supervivencia correlaciona con un aumento de los niveles plasmáticos de vitamina D (Nigwekar y Thadhani, 2013). En el programa NHANES III, niveles bajos de 25-hidroxicolecalciferol se asociaron con un aumento en la prevalencia de la albuminuria de forma independiente de la edad, del sexo, de la etnia, de si eran fumadores o no, del índice de masa corporal y de la función renal (Rojas-Rivera y cols., 2010). También se asociaron con una disminución del IFGe y con la progresión de la enfermedad crónica renal, lo cual sugiere la activación del receptor de vitamina D como una posible estrategia para disminuir la albuminuria (Molina y cols., 2014). Además, en estos pacientes se ha asociado una disminución en los niveles plasmáticos de vitamina D con marcadores de inflamación (Amer y Qayyum, 2012) y disfunción endotelial (Tare y cols., 2011).

La vitamina D tiene una gran importancia en la patología renal, ya que actúa como inhibidor de la expresión de renina, de VEGF y como activador de SOD (Li y cols., 2002; Lee y cols., 2008; Zhong y cols., 2014), de esta manera regula la angiogénesis y la defensa antioxidante en las CE. (Li y cols., 2002; Valcheva y cols., 2014; Zhong y cols., 2014). Por otro lado, la regulación de la vitamina D sobre el SRA se puede deber a una interacción con los receptores de mineralocorticoides, ya que los dos receptores pertenecen a la misma superfamilia (Lucisano y cols., 2013). En pacientes con enfermedad renal en estadio terminal existe una asociación significativa e inversa entre los niveles de 25-hidroxicolecalciferol y los niveles de MMP9 plasmáticos (Wasse y cols., 2011) y un aumento de la rigidez arterial (Mheil y cols., 2011; Seker y cols., 2013; Lieberman y cols., 2013), acompañado por una alteración del contenido en colágeno y elastina en aorta (Andrukhova y cols., 2014).

5.2.3 SÍNTESIS DE VITAMINA D

Sólo del 10-20% de la vitamina D de nuestro organismo la obtenemos de la dieta ya que hay muy pocos alimentos que la contengan. Por lo tanto, alrededor del 90% de los requerimientos de vitamina D se obtienen de la exposición al sol (Holick, 2004). La vitamina D comienza su síntesis en la piel a partir del 7-dehidrocolesterol, en un proceso que requiere luz ultravioleta (UV)B (290-315 nm). Posteriormente, para llevar a cabo el proceso de activación, la vitamina D pasa a sangre, donde se une a la proteína de unión de vitamina D (DBP) y en una pequeña proporción a albúmina (Nigwekar y Thadhani, 2013). El primer paso de su activación se lleva a cabo en el hígado y consiste en una hidroxilación en la posición 25 por acción de la enzima CYP27A1, para dar lugar al 25-hidroxicolecalciferol o calcidiol. Esta molécula se une de nuevo a la DBP para llegar al riñón. Allí, en las células de los túbulos proximales sufre la segunda hidroxilación en la posición 1 α - por acción de la enzima CYP27B1 o 1 α -hidroxilasa, para dar

1,25-dihidroxicolecalciferol, o calcitriol que es la forma activa de la vitamina D (Jones, 2007; Pilz y cols., 2009; Normal y Powell, 2014).

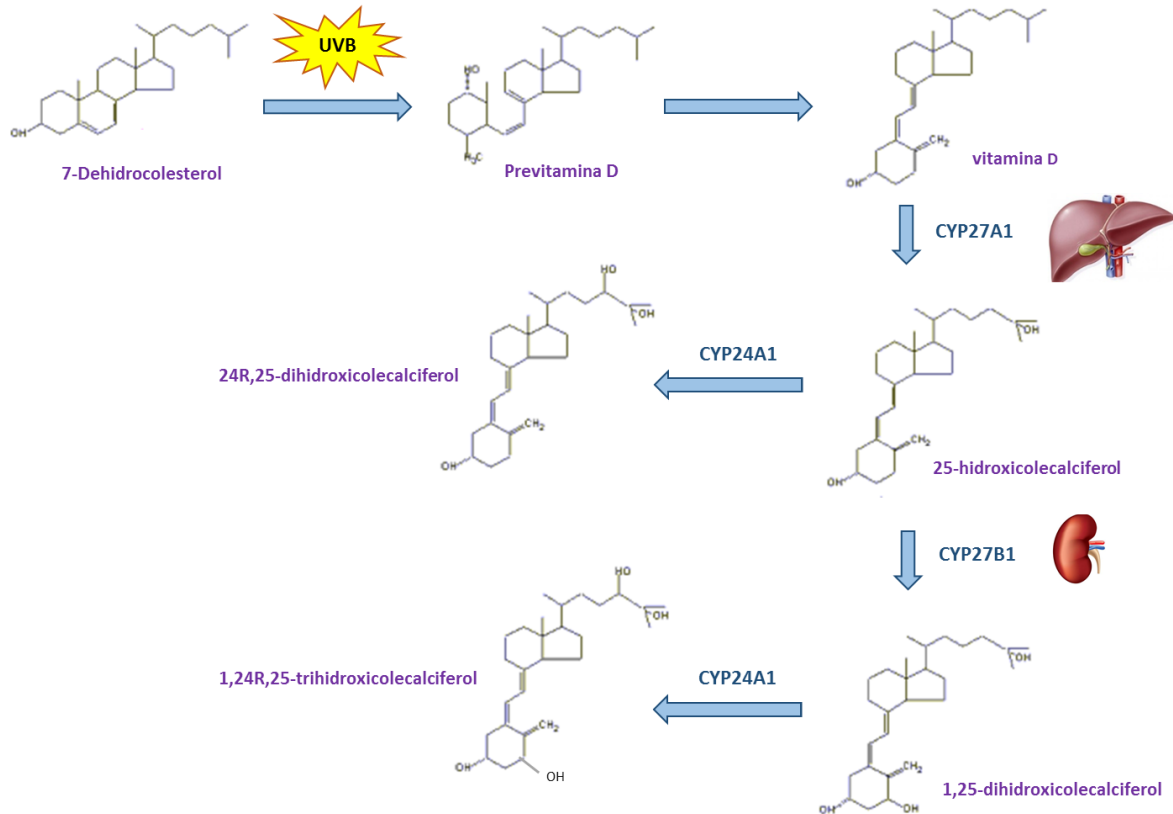


Figura 11. Esquema explicativo de la síntesis y metabolismo de vitamina D en el organismo

La mayoría de las células CV como CMLV o CE y células inflamatorias como macrófagos expresan CYP27B1, lo cual indica la existencia de una síntesis local de calcitriol. Debido a esta síntesis local la concentración de la forma activa a nivel tisular puede diferir de la circulante. Por ello, se consideran los niveles tisulares de calcitriol proporcionales a la cantidad de 25-hidroxicolecalciferol circulante, de tal manera que la determinación de 25-dihidroxicolecalciferol se considera el mejor indicador del nivel de vitamina D del organismo (Holick, 2004; Jones, 2007; Pilz y cols., 2009; Lee y cols., 2008; Normal y Powell, 2014).

5.2.3.1 REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE VITAMINA D

El proceso de síntesis de calcitriol se regula a varios niveles. La enzima CYP27B1 presenta una regulación mediante retroalimentación negativa, por el propio calcitriol. Además el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)-23 inhibe su transcripción, mientras que la PTH la regula

al alza. La regulación de la 1α -hidroxilasa a nivel extrarrenal es controvertida. Algunos autores afirman que no se regula por la PTH o FGF-23, pero sí por mediadores inflamatorios (Rojas-Rivera y cols., 2010). Otros han descrito que FGF-23 es capaz de inhibir la expresión de CYP27B1 a nivel extrarrenal, en monocitos, jugando un papel importante en la regulación de la respuesta inmune (Bacchetta y cols., 2013).

La regulación de la concentración de calcitriol también se lleva a cabo mediante un mecanismo de metabolización de la vitamina activa a través de otra enzima perteneciente a la familia del citocromo P450, como es la CYP24A1 o 24-hidroxilasa, que inactiva tanto a 25-hidroxicolecalciferol como a $1\alpha,25$ -dihidroxicolecalciferol mediante una hidroxilación en la posición 24, generando 24R,25-dihidroxicolecalciferol y $1\alpha,24,25$ -trihidroxicolecalciferol respectivamente (figura 11). Esta hidroxilasa se expresa en los tipos celulares donde lo hace la 1α -hidroxilasa y el VDR (Jones, 2007; Richart y cols., 2007). A nivel renal esta enzima está regulada al alza por la propia molécula de calcitriol (Rojas-Rivera y cols., 2010), mientras que FGF-23 la activa, la PTH inhibe su transcripción (Jones, 2007; Bosworth y de Boer, 2013).

Por último, se ha descrito que la molécula de calcitriol induce la expresión de megalina en las células del túbulo proximal. La megalina es una proteína con una función muy importante en el mantenimiento de los niveles de vitamina D porque es la encargada de recaptar la vitamina D, unida a la DBP, que se filtra en el glomérulo renal y así evitar su pérdida en la orina (Rojas-Rivera y cols., 2010).

5.2.4 MECANISMO DE ACCIÓN

La vitamina D es una hormona esteroidea. Realiza su acción a través de la unión a su receptor, el receptor de vitamina D (VDR), que pertenece a la superfamilia de receptores nucleares. La vitamina D, al ser liposoluble, es capaz de atravesar la membrana celular y unirse a su receptor en el interior del núcleo (Jones, 2007). Una vez unida al receptor de vitamina D (VDR) forma un heterodímero con el receptor X retinoide, y se une a secuencias específicas de ADN. Aproximadamente el 3% del genoma humano está de forma directa o indirecta, regulado por la vitamina D.

Las acciones fisiológicas de la vitamina D se dividen en dos tipos: i) clásicas, aquellas que regulan la concentración sanguínea de calcio y fosfato a través de acciones en el intestino, hueso, glándula paratiroides y riñón y ii) funciones no clásicas como la diferenciación celular, efectos antiproliferativos en varios tipos celulares como médula ósea, sistema inmune, piel, células del epitelio prostático, músculos e intestino. Además se ha descrito que tiene efectos sobre el sistema CV, sistema inmune y endocrino (Norman, 2006; Jones, 2007). Por otro lado,

la vitamina D también puede llevar a cabo respuestas rápidas no genómicas como la absorción de calcio en el intestino o la secreción pancreática de insulina, la apertura de canales de calcio y cloro dependientes de voltaje en osteoblastos y la migración de CE (Norman, 2006).

El 1,25-dihidroxicolecalciferol regula los genes que codifican para la expresión de renina en el riñón, la liberación de citoquinas en los linfocitos y crecimiento y/o proliferación de CMLV y cardiomiocitos, regula el estrés oxidativo, el transporte de membrana, la homeostasis de MEC y la adhesión celular (Lee y cols., 2008). La mayoría de las células CV expresan VDR, como CMLV, CE, cardiomiocitos, células del sistema inmune y plaquetas (Normal y Powell, 2014). En el sistema renal, el VDR se localiza en el epitelio de túbulo proximal y distal, en el epitelio parietal del glomérulo, en las células del ducto colector en el aparato yuxtaglomerular y en los podocitos renales (Chokhandre y cols., 2015).

5.2.5 SUPLEMENTO CON VITAMINA D

A pesar de que se sabe que una disminución en la concentración de vitamina D a nivel plasmático tiene consecuencias negativas en la enfermedad crónica renal, las estrategias terapéuticas a seguir no están todavía claras. Los resultados del tratamiento con vitamina D sobre enfermedades CV han sido contradictorios y los ensayos clínicos no muestran evidencias firmes sobre los beneficios de este tratamiento (Rojas-Rivera y cols., 2010; Bosworth y de Boer 2013). Sin embargo, el calcitriol y otros agonistas del VDR, se han usado ampliamente en el tratamiento de hiperparatiroidismo secundario en pacientes en hemodiálisis. Estudios en animales han mostrado los beneficios de este tratamiento en la preservación y restauración de la función renal (Sonneveld y cols., 2016), así como estudios observacionales lo han relacionado con una disminución del riesgo de mortalidad en pacientes con enfermedad renal crónica que tienen una deficiencia (Seker y cols., 2013; de Medeiros Cavalcante y cols., 2015). Se ha observado que el suplemento con vitamina D disminuye marcadores de inflamación y aumenta la capacidad antioxidante total (Cavalcante y cols., 2015) disminuyendo además la VOP (Martins y cols., 2014).

Por otro lado, la administración de vitamina D es capaz de disminuir la albuminuria (Agarwal y cols., 2005; Alborzi y cols., 2008; Wu-Wong y cols., 2009; Nigwekar y Thadhani, 2013; Molina y cols., 2014; Chokhandre y cols., 2015). Son muchos los posibles mecanismos por los cuales los agonistas del receptor de vitamina D presentan efectos antialbuminúricos, como la supresión del SRA, la disminución de la respuesta inflamatoria, la disminución del acúmulo de monocitos, neutrófilos, efectos antiproliferativos y la disminución del daño en podocitos restaurando la BFG (Lucisano y cols., 2013). Algunos estudios identifican a los

podocitos como una diana del calcitriol ya que expresan VDR y la administración de esta molécula los protege de efectos dañinos (Lucisano y cols., 2013). La activación del receptor de vitamina D por parte de paricalcitol y calcitriol, disminuye significativamente las lesiones fibróticas de forma dosis dependiente a través de la inducción de la expresión de factores antifibróticos (Li y cols., 2005).

El calcitriol *per se*, no tiene capacidad intrínseca como molécula neutralizante de EROs, su actividad reductora del estrés oxidativo radica en el aumento de la transcripción de las enzimas antioxidantes como SOD y en la disminución de la transcripción de enzimas oxidantes como NOX2, NOX4 inducida por Ang II, ya que disminuye la expresión de AT1 (Zhang y cols., 2008; Dong y cols., 2012). Disminuye la infiltración intersticial de células inflamatorias (Wu-Wong y cols., 2009; Finch y cols., 2012) y de marcadores de inflamación como TNF α e IL-6 (Normal y Powell, 2014). Además incrementa la actividad de la eNOS y la síntesis de prostaciclina (Pilz y cols., 2009). Todo esto aumenta la biodisponibilidad de NO y mejora la relajación dependiente de endotelio en arterias renales (Sugden y cols., 2008; Harris y cols., 2011; Normal y Powell 2014; Uberti y cols., 2014; Takenaka y cols., 2014)

6 RATAS MUNICH WISTAR FRÖMTER COMO MODELO EXPERIMENTAL DE DESARROLLO DE ALBUMINURIA

Las ratas Munich Wistar Frömter (MWF), son un modelo genético de desarrollo de albuminuria e hipertensión moderada que aparece de forma espontánea y progresiva con la edad (Macconi y cols., 2000). Nacen con un déficit del 30-50% en el número de nefronas que a las 4 semanas de edad ya se manifiesta en una hipertrofia glomerular compensatoria (Ijpelaar y cols., 2008). La disminución del número de nefronas con las que nacen las ratas MWF se debe a un empeoramiento en la nefrogénesis temprana (Shulte y cols., 2012). Esto se traduce en una disminución del número de nefronas que llega al 39,7% a las 12 semanas de edad (Rothermund y cols., 2001), mientras que la presión de los capilares glomerulares en ratas MWF es normal (Macconi y cols., 2006).

Este modelo presenta una disminución progresiva de los podocitos renales, seguida de glomeruloesclerosis, disfunción endotelial y de albuminuria (Ijpelaar y cols., 2008; Macconi y cols., 2009). En este modelo, la albuminuria aparece a las 6 semanas de edad (van Es y cols., 2011), aunque muestra un marcado dimorfismo sexual. Tanto machos como hembras nacen con una disminución en el número de nefronas, sin embargo la progresión de la albuminuria y la subsiguiente insuficiencia renal es mucho más pronunciada en machos que en hembras

(Schulz y Kreutz, 2012). Los últimos estudios proponen a la acción de la testosterona, a través del receptor de andrógenos, como el responsable de este dimorfismo (Herlan y cols., 2015).

En este modelo animal se ha descrito que los loci de carácter cuantitativo (QTL; *quantitative trait locus*) responsables de la albuminuria se sitúan en los cromosomas 6 y 8. Se ha descrito que la transferencia del cromosoma 6 y del 8 de ratas espontáneamente hipertensas, pero no albuminúricas SHR (*spontaneously hypertensive rats*) al fondo genético de ratas MWF genera ratas consómicas MWF-6^{SHR} Y MWF-8^{SHR} (figura 12) que presentan una disminución significativa de la albuminuria (van Es y cols., 2011).

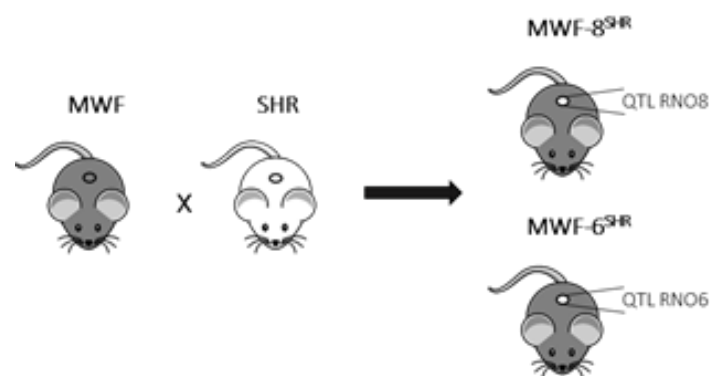


Figura 12. Esquema de la obtención de la cepa de ratas consómicas MWF-6^{SHR} Y MWF-8^{SHR}

En el caso de MWF-6^{SHR} el nivel de albuminuria se normaliza a niveles de animales control normotensos y normoalbuminúricos como son las ratas Wistar Kyoto (WKY), ya que desaparece el déficit innato de nefronas. Esto sugiere que en las ratas MWF la adaptación funcional al déficit innato de nefronas es un importante requisito para la aparición de albuminuria. Este aumento en el número de nefronas se acompaña de la desaparición del daño glomerular y tubulointersticial que tienen las ratas MWF (Schulz y cols., 2008). En las ratas consómicas MWF-6^{SHR} se produce una disminución de la fibrosis intersticial, lo que sugiere que el cromosoma 6 también está relacionado con el proceso de fibrosis que sufren estos animales (Schulz y cols., 2003). Recientemente estudios en ratas dobles consómicas MWF-6^{SHR}-8^{SHR} han confirmado el papel sinérgico de esos dos cromosomas, ya que en estas ratas tanto la albuminuria como los cambios estructurales en el glomérulo y el túbulo, se eliminaron completamente (van Es y cols., 2011).

En este modelo animal la albuminuria está asociada con un aumento de la rigidez arterial y una disminución en el contenido de elastina en los vasos sanguíneos. En concordancia, la introducción del cromosoma 6 y 8 por separado de ratas SHR en el fondo genético de MWF

disminuye tanto la rigidez arterial como la albuminuria de forma independiente a la disminución de la presión arterial (Gil-Ortega y cols., 2015).

Finalmente, el tratamiento con inhibidores del SRA ha mostrado beneficios también en modelos animales de albuminuria como son las ratas MWF. Este modelo animal presenta una disminución significativa de la densidad de vasos sanguíneos a nivel renal que revierte con el tratamiento con iECA y con ARA II, que además se acompaña por la disminución de la expresión a nivel renal de ET-1 (Remuzzi y cols., 2016). Incluso a edades avanzadas a las que las ratas MWF muestran niveles de albuminuria muy elevados, la inhibición del SRA disminuye la presión sanguínea y la albuminuria, disminuyendo a su vez la glomeruloesclerosis y el daño tubulointersticial (Remuzzi y cols., 2002) y aumentando el número de podocitos por glomérulo (Macconi y cols., 2009).

Otros modelos experimentales de albuminuria se basan en la inducción de la misma por la administración de sustancias tóxicas como adriamicina, estreptozotocina, o por métodos físicos como la ablación renal. Estos modelos son artificiales y presentan la problemática de que las toxinas administradas, o la activación hormonal tras la ablación renal, pueden tener efectos por sí mismos sobre los vasos sanguíneos. Por eso es preferible usar el modelo genético de desarrollo de albuminuria espontánea, como son las ratas MWF, para estudiar los mecanismos asociados a la presencia de albuminuria *per se* (Gschwend y cols., 2002).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Son muchos los estudios que proponen a la albuminuria como marcador de disfunción endotelial a nivel renal que refleja, a su vez, un daño vascular a nivel sistémico. Este daño, es además característico de alteraciones como la hipertensión (Abdelhafiz y cols., 2011;). Se sabe, que la disfunción endotelial se relaciona con un aumento de estrés oxidativo (Singh y cols., 2013) y éste a su vez con alteraciones en la actividad de proteínas como la MMP2 y la MMP9 (Rajagopalan y cols., 1996). La estrategia terapéutica más utilizada en el tratamiento de la hipertensión, que además disminuye la excreción urinaria de albúmina, es el bloqueo del SRA tanto con iECAs como con ARA II. Sin embargo, recientemente se ha descrito que pacientes hipertensos que se encuentran bajo este tratamiento desarrollan un escape de albuminuria también denominado albuminuria resistente, pese a presentar un buen control de la presión arterial (Cerezo y cols., 2012). Dado que la albuminuria contribuye a la progresión de la insuficiencia renal y cardiovascular, los mecanismos implicados en su aparición se pueden considerar como dianas terapéuticas comunes para ambos sistemas (Rabelink y Zeeuw, 2015). A pesar de ello, no se han estudiado los mecanismos implicados en el desarrollo de albuminuria resistente al bloqueo del SRA.

En este contexto, las hipótesis planteadas en este estudio son:

1. la albuminuria podría estar relacionada con alteraciones en la función vascular y en la actividad de proteasas de matriz extracelular como son las gelatinasas MMP2 y MMP9. Estas alteraciones a su vez, podrían deberse a un desajuste en el equilibrio oxidativo,
2. el desajuste en la actividad de las gelatinasas MMP2 y MMP9, así como en el equilibrio oxidativo, podrían tener una implicación traslacional en estados patológicos que aparecen en la práctica clínica como la albuminuria resistente al bloqueo del SRA,
3. la suplementación con calcitriol como estrategia terapéutica para corregir el desajuste en el equilibrio oxidativo, podría controlar la aparición de la albuminuria y las alteraciones asociadas a la misma.

Los objetivos propuestos para el estudio de estas hipótesis fueron:

1. caracterizar un modelo genético de desarrollo espontáneo de albuminuria, estudiando la función vascular y marcadores de daño renal, como son el estrés oxidativo y la actividad de las MMPs,

2. estudiar si los marcadores de daño oxidativo y de remodelado son exclusivamente dependientes del desarrollo de albuminuria y no dependen de la presencia de hipertensión,
3. determinar si los marcadores alterados en el modelo genético de albuminuria lo están también en pacientes hipertensos controlados que desarrollan albuminuria resistente al bloqueo del SRA,
4. caracterizar los mecanismos implicados en la alteración de los marcadores de remodelado de matriz extracelular en estos pacientes y
5. determinar si un tratamiento crónico con calcitriol revierte la albuminuria en el modelo experimental y sus marcadores de daño asociados, como son la disfunción endotelial, el aumento de estrés oxidativo y el aumento en la actividad de las MMPs.

MATERIAL Y MÉTODOS

1 MODELOS EXPERIMENTALES

El estudio se realizó utilizando distintos modelos experimentales de rata macho de entre 12 y 14 semanas de edad. Los animales permanecieron estabulados en condiciones controladas de humedad (45-50 %) y temperatura ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$), con un ciclo de 12 horas de luz (8:00-20:00h) y 12 horas de oscuridad (20:00-8:00h). Todos ellos tuvieron acceso *ad libitum* a agua y comida.

La estabulación y utilización de los animales se realizó de acuerdo con la guía “*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*”, publicada por el “*US National Institute of Health*” (NIH publicación número 85-23, revisado en 2011) y la legislación española para el uso de animales de experimentación (RD 1205/2005 y RD 53/2013). Todos los protocolos experimentales se aprobaron por el Comité Ético de experimentación animal de la Universidad Complutense de Madrid.

1.1 DESCRIPCIÓN DE LOS MODELOS EXPERIMENTALES

Ratas Munich Wistar Frömter (MWF): Este modelo de rata presenta albuminuria a partir de las 6 semanas de edad, y niveles normales de presión arterial a las 12-14 semanas. (Charité; Berlín, Alemania).

Ratas espontáneamente hipertensas (SHR, del inglés, Spontaneously Hypertensive Rats): Es un modelo de rata que deriva de la cepa Wistar Kyoto que desarrolla de manera espontánea hipertensión a partir de las 4 semanas de edad, pero que a la edad utilizada en el estudio (12-14 semanas) no presenta albuminuria (Charles River, España).

Ratas consómicas MWF-8^{SHR}: Es una cepa de rata que se obtiene al sustituir el cromosoma 8 de la cepa MWF, que es responsable de la albuminuria en este modelo animal (van Es y cols., 2011), por el respectivo cromosoma de la cepa SHR. De esta manera, se obtiene esta nueva cepa que no presenta ni hipertensión ni albuminuria a las edades estudiadas (Charité; Berlín, Alemania).

Ratas Wistar Kyoto (WKY): Esta cepa no presenta albuminuria ni hipertensión. Es la cepa de la que derivan las ratas SHR por lo que se utilizó en el estudio como control de las ratas SHR y ratas consómicas MWF-8^{SHR} (Charles River, España).

Ratas Wistar: Esta cepa no presenta albuminuria ni hipertensión, por lo que se utilizó en el estudio como control de las ratas MWF. (Charles River, España).

1.2 PROTOCOLO SEGUIDO EN EL TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO CON CALCITRIOL EN RATAS MWF Y WISTAR

Este estudio se realizó en ratas MWF y como controles se utilizaron ratas Wistar como se muestra en el esquema (figura 13). Los animales se recibieron con 5 semanas de edad y se estabularon en jaulas por parejas. Se les permitió libre acceso a agua y comida durante todo el tiempo que duró el estudio. Tras la recepción se dejó una semana para que los animales se aclimasen y transcurrido este tiempo, se dividieron aleatoriamente en 2 grupos. Uno de los grupos fue tratado con calcitriol (Rocaltrol®; 0,25µg/Kg/día) disuelto en una solución de suero salino (0,9 % NaCl) para alcanzar un volumen de inyección de 300 µL. El otro grupo fue tratado con vehículo (sorbitol, Sigma; disuelto en solución de suero salino a la misma concentración a la que se encontraba en la preparación farmacéutica). El tratamiento se realizó diariamente por vía subcutánea y tuvo una duración de 7 semanas. Los animales se introdujeron, 48 horas antes de su sacrificio en una jaula metabólica, a fin de recoger la orina generada durante 24 horas.

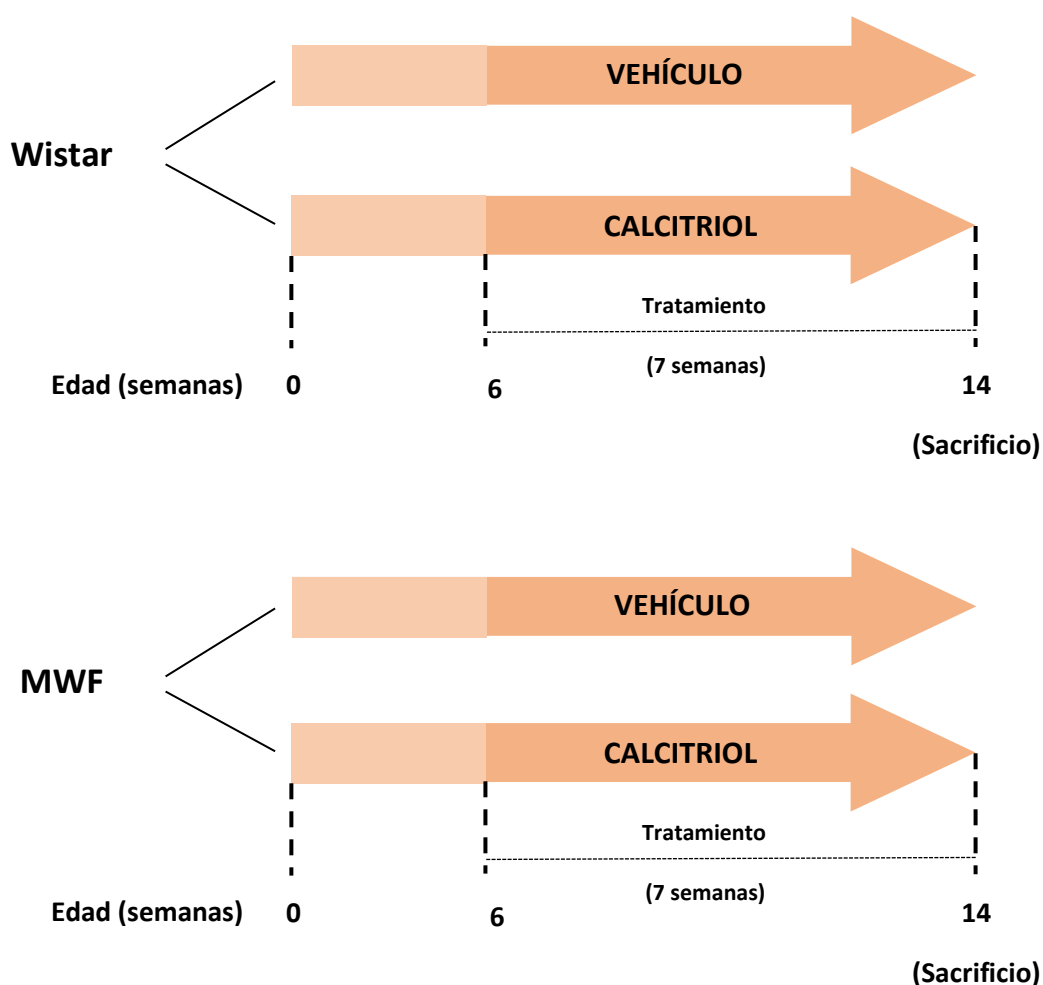


Figura 13. Esquema del protocolo seguido para realizar el tratamiento con calcitriol o vehículo en las ratas albuminúricas MWF y controles Wistar.

2 ESTUDIO EN PACIENTES

2.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES

Los estudios en pacientes se llevaron a cabo en la Unidad de Hipertensión del Hospital Universitario 12 de Octubre. Entre enero de 2012 y junio de 2013 se preseleccionaron 51 pacientes con hipertensión esencial y sin albuminuria. Como requisitos de inclusión indispensables, los pacientes firmaron un consentimiento informado, siendo todos ellos mayores de 18 años al inicio del estudio. El estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del hospital.

El personal facultativo de la Unidad de Hipertensión realizó un seguimiento durante 2 años de los pacientes. Durante este tiempo, los pacientes estuvieron bajo supresión crónica del SRA, con iECA, o con ARA II. En caso de que el tratamiento no fuese suficiente para conseguir un buen control de la presión arterial, tanto sistólica como diastólica (PAS 120-129mmHg; PAD 80-84 mmHg, respectivamente), se añadieron al tratamiento anterior otros fármacos como diuréticos, antagonistas de calcio o β -bloqueantes. Del total de pacientes preseleccionados para el estudio, se excluyó a aquellos que presentaron diabetes mellitus (9 pacientes) y/o hiperaldosteronismo primario (3 pacientes). Finalmente, como se muestra en la figura 14 se seleccionó a 39 pacientes hipertensos que debido al tratamiento antihipertensivo pautado, presentaron valores de presión arterial controlados.

2.2 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE MASA CORPORAL

El índice de masa corporal (IMC) se determinó utilizando los valores de altura y de peso que se obtuvieron en consulta mediante la siguiente fórmula:

$$\text{IMC} = \text{peso (Kg)} / \text{altura}^2 \text{ (m)}$$

2.3 DETERMINACIÓN DE LA FUNCIÓN RENAL DE LOS PACIENTES AL FINALIZAR EL ESTUDIO

2.3.1 DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE FILTRADO GLOMERULAR ESTIMADO

El índice de filtrado glomerular estimado (IFGe) se calculó utilizando la fórmula CKD-EPI (del inglés, Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) a través de la página web www.merckmanuals.com/medical-calculators/GFR_CKD_EPI.htm. Esta fórmula tiene en cuenta el valor de creatinina sérica, la edad y la raza para proporcionar un valor que es indicador de la función renal.

2.3.2 DETERMINACIÓN DE LA EXCRECIÓN URINARIA DE ALBÚMINA

En las muestras de orina recogida durante 24 horas se determinó la concentración de albúmina. Este parámetro se utilizó para determinar posteriormente el cociente albúmina/creatinina.

Durante los dos años que duró el seguimiento, a pesar del buen control de la presión arterial, algunos de los pacientes incluidos en el estudio desarrollaron un aumento de la excreción urinaria de albúmina dentro de los valores considerados como albuminuria. La excreción urinaria de albúmina desarrollada bajo tratamiento antihipertensivo se denominó albuminuria resistente.

En función de este último parámetro se separó a los pacientes en 3 grupos de la siguiente manera (figura 14):

Pacientes normoalbuminúricos: aquellos que al finalizar el estudio presentaron valores del cociente albúmina/creatinina en orina <20 mg/g en hombres o <30 mg/g en mujeres.

Pacientes con albuminuria resistente moderada: aquellos que al finalizar el estudio presentaron valores del cociente albúmina/creatinina en orina comprendida en el rango de >20 y ≤ 200 mg/g en hombres o >30 y ≤ 300 mg/g en mujeres.

Pacientes con albuminuria resistente severa: aquellos que al finalizar el estudio presentaron valores del cociente albúmina/creatinina en orina >200 mg/g en hombres o > 300 mg/g en mujeres.

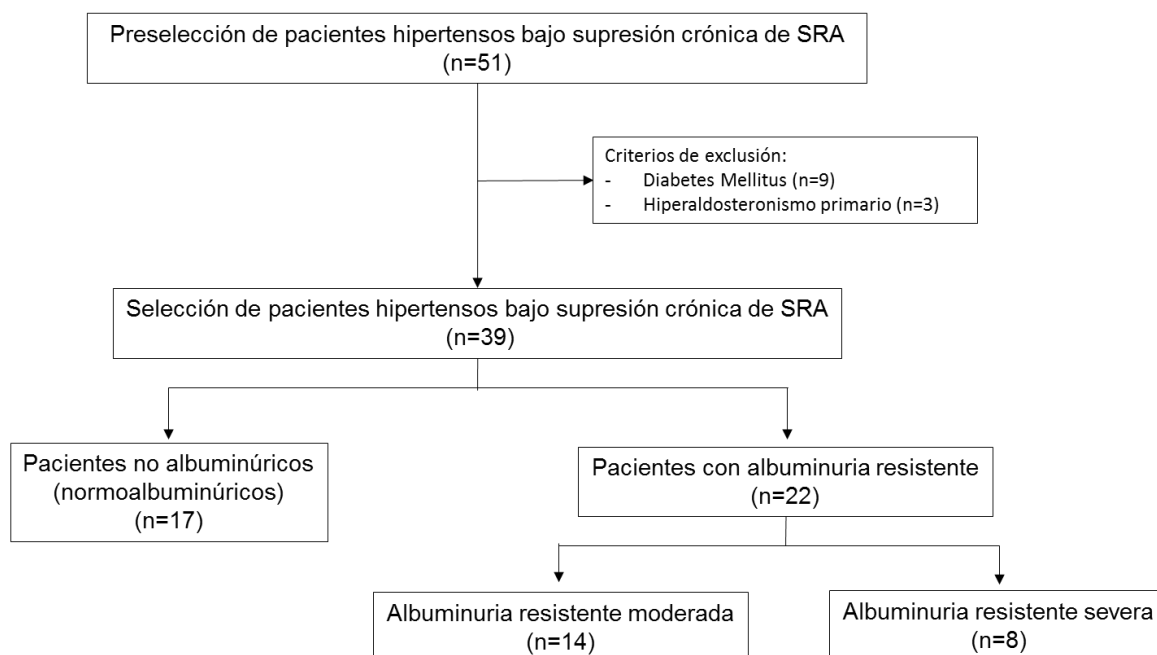


Figura 14. Esquema del sistema de inclusión de pacientes en el estudio.

3 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS HEMODINÁMICOS EN MODELOS EXPERIMENTALES Y PACIENTES

3.1 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS HEMODINÁMICOS EN LOS MODELOS EXPERIMENTALES TRAS EL TRATAMIENTO CON CALCITRIOL

El último día de tratamiento se pesó a los animales y se determinaron los parámetros hemodinámicos [presión arterial sistólica (PAS), frecuencia cardiaca (FC), presión de pulso (PP) y VOP] por medida directa en los animales previamente anestesiados con una mezcla de ketamina/xilacina (50-80 mg/kg i.p.) (Somoza y cols., 2005). Tanto en la arteria carótida derecha como en la arteria femoral derecha se insertaron sendos catéteres, que se encontraban conectados a sus respectivos transductores de presión (Statham, Harvard Aparatos GMBH, Alemania). La onda de presión se registró mediante el sistema de adquisición de datos (PowerLab 4/30) y se analizó con el programa de análisis de registros (LabChart 7.0 Pro, ADInstruments). Se utilizó el registro obtenido a través de la arteria carótida para determinar los valores de PAS, FC y PP.

Para determinar el parámetro de VOP se midió la distancia que había entre los extremos de las dos cánulas y el valor resultante se dividió entre el tiempo de desfase entre la onda de

presión registrada en la arteria carótida y la registrada en la arteria femoral, según la siguiente fórmula:

$$\text{VOP} = \text{Distancia entre cánulas (m)} / \text{tiempo de desfase entre ondas (s)}$$

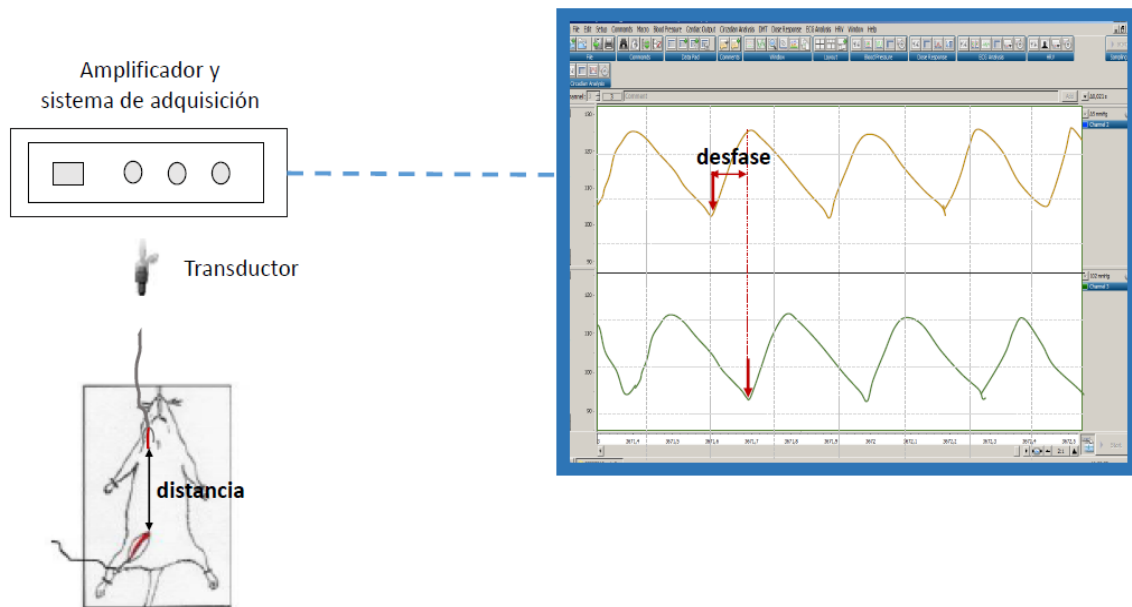


Figura 15. Esquema representativo de la obtención de parámetros hemodinámicos mediante la canulación tanto de la arteria carótida como femoral en la rata anestesiada.

3.2 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS HEMODINÁMICOS EN PACIENTES

3.2.1 DETERMINACIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL

La presión arterial se determinó en consulta, mediante tres medidas consecutivas utilizando un equipo semiautomático (OMRON). Así mismo, se monitorizó la presión arterial durante 24 horas utilizando un monitor (Spacelabs-90207/17) que registró la presión arterial cada 20 minutos en el periodo de vigilia del paciente y cada 30 minutos durante el periodo de sueño.

3.2.2 DETERMINACIÓN DE LA VELOCIDAD DE ONDA DE PULSO

La medida estándar para el estudio de la rigidez arterial es la VOP determinada entre arteria carótida y femoral (Laurent y cols., 2006). Ésta se determinó en los pacientes utilizando el equipo Sphygmocor (ArtCor, Sydney, Australia). Este sistema integra un tonómetro de aplanación con el que se obtienen las ondas de pulso en arteria carótida y arteria femoral, y un electrocardiograma que permite en base a la onda R, la sincronización de los tiempos de la

onda de pulso en ambas arterias, para así determinar el tiempo de desfase de la onda. La VOP se calcula a partir del tiempo de tránsito de la onda desde la carótida a la femoral y la distancia entre el punto en el que se coloca el tonómetro en estas dos arterias (Laurent y cols., 2006). Para determinar este último parámetro se realiza la medida de la distancia entre la carótida y la apófisis (distancia proximal) y la distancia entre la apófisis y el punto donde se coloca el tonómetro en la femoral (distancia distal). La fórmula utilizada para obtener la velocidad de onda de pulso es la siguiente:

$$\text{VOP} = \text{distancia (metros)} / \text{incremento de tiempo (segundos)}$$

4 OBTENCIÓN DE MUESTRAS EN PACIENTES Y EN LOS MODELOS EXPERIMENTALES

4.1 SACRIFICIO Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS EN LOS DISTINTOS MODELOS EXPERIMENTALES

Se sacrificó a los animales mediante desangrado, la sangre se recogió en tubos heparinizados para la posterior obtención del plasma mediante centrifugación a 4°C, durante 10 minutos, a 2000 rpm (centrífuga Centra MP4/MP4R, IEC Thermo Scientific). El plasma obtenido, se guardó a -80°C hasta su utilización. Para recoger la orina generada durante 24 horas, los animales se introdujeron, 48 horas antes de su sacrificio, en una jaula metabólica. La orina producida en las primeras 24 horas se descartó y se utilizó la que se obtuvo durante las 24 horas anteriores al sacrificio del animal se guardó a -80°C para las posteriores determinaciones. Las determinaciones bioquímicas en plasma de la concentración de 25-hidroxicolecalciferol, de calcio y de fósforo y de creatinina tanto en plasma como en orina y la de albúmina en orina de las ratas, se llevaron a cabo en el laboratorio de análisis clínicos Labipath del Hospital de la VOT, Madrid.

Se extrajeron los riñones y se pesaron. Los pesos se corrigieron por la longitud de la tibia (parámetro relacionado con el crecimiento del animal) o con el peso corporal a fin de poder establecer comparaciones entre los distintos grupos experimentales. Posteriormente se congelaron a -80°C hasta su homogenización mecánica en nitrógeno líquido con ayuda de un mortero. El homogenizado se recogió en un tampón específico para cada técnica y se centrifugó a 12000 rpm, a 4°C, durante 15 min. Se descartó el precipitado y se recogió guardó el sobrenadante que contenía las proteínas solubilizadas.

Para los estudios de función vascular y de microscopía confocal se aisló la arteria aorta y se colocó en una placa Petri que contenía una solución de Krebs Henseleit (KH, 115 mM NaCl; 4,6 mM KCl; 2,5 mM CaCl₂·2H₂O; 25 mM NaHCO₃; 1,2 mM KH₂PO₄; 1,2 mM MgSO₄·7H₂O; 0,01 mM EDTA; 11,1 mM glucosa) a 4°C. Con ayuda de una lente binocular (Leica GZ4) se retiró el tejido conectivo y el tejido adiposo perivascular y se obtuvieron segmentos de 2 mm de longitud que se utilizaron inmediatamente.

4.2 OBTENCIÓN DE PLASMA EN PACIENTES Y DETERMINACIONES POSTERIORES

Para evitar la coagulación, la sangre se recogió en tubos que contenían tanto EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) como heparina de litio como anticoagulantes para su uso en función del análisis a realizar. La obtención de plasma se realizó como se indica en el punto 4.1, una vez obtenido se almacenó a -80°C hasta su utilización.

El análisis de los parámetros plasmáticos, creatinina sérica, 25-hidroxicolecalciferol, colesterol total, colesterol HDL (*high density lipoprotein*), colesterol LDL (*low density lipoprotein*) y triglicéridos, se realizó en el Servicio de Bioquímica del hospital.

En clínica se realiza la determinación plasmática de 25-hidroxicolecalciferol en lugar de determinar la concentración del metabolito activo, 1,25-dihidroxicolecalciferol. Esto se debe a que la vida media de 25-hidroxicolecalciferol es de 2 semanas en plasma, mientras que la concentración plasmática de 1,25-dihidroxicolecalciferol tiene una vida media en plasma de 4 horas y su concentración es 1000 veces menor. Además, la disminución de la concentración de 1,25-dihidroxicolecalciferol provoca un aumento en la secreción de PTH, que activa a la 1 α -hidroxilasa renal para aumentar la concentración de 1,25-dihidroxicolecalciferol, lo que puede llevar a un error en el diagnóstico de la hipovitaminosis D (Holick, 2004).

4.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES EN PLASMA DE PACIENTES Y RATAS Y EN HOMOGENIZADO DE RIÑÓN DE RATA

La concentración de proteínas totales se determinó por colorimetría según el método descrito por Bradford (1976). Este método se basa en la reacción de los grupos sulfonados ácidos del azul de Coomassie (reactivo de Bradford) con los grupos amino libres de los aminoácidos básicos (arginina, lisina e histidina) presentes en las proteínas. Como resultado de esta reacción se genera un compuesto coloreado (azul) que presenta un máximo de absorbancia a 595 nm.

El ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos. En cada pocillo, se añadieron 5 μ L de muestra y 200 μ L de reactivo Protein Assay (Biorad). Tras una incubación de 5 minutos, a 25°C, se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm (ELx808; Bio-Tek). Para cuantificar la concentración de proteínas se utilizó una curva patrón de albúmina sérica bovina (Sigma-Aldrich, España; BSA; 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,6; 0,8; 1 mg/mL).

5 ESTUDIOS EN AORTA TORÁCICA AISLADA EN LOS MODELOS EXPERIMENTALES

5.1 ESTUDIOS DE FUNCIÓN VASCULAR

Los estudios de función vascular se llevaron a cabo en un baño de órganos en el que se montaron segmentos de aorta torácica. Cada uno de los segmentos se introdujo entre dos alambres horizontales de acero rígido de 300 μ m de diámetro según el método descrito por Nielsen y Owman (1971). Uno de los alambres se encuentra fijo, unido a la pared del baño, y el otro, que se desplaza paralelamente al anterior, está unido a un transductor de fuerza isométrica (Pioden UF-1, LCD Systems). El transductor, a su vez, está conectado a un amplificador y a un sistema de adquisición de datos PowerLab 8/35 (ADInstruments). Este sistema permite registrar los cambios de tensión producidos en la pared arterial. El análisis de los registros obtenidos se realizó con ayuda del software LabChart 7.0 Pro (ADInstruments). El baño de órganos donde se colocaron los segmentos arteriales contenía una solución KH a temperatura constante (37°C) y burbujeada durante todo el tiempo que duró el experimento con una mezcla de gases (95% O₂ y 5% CO₂), manteniéndose a pH fisiológico entre 7,3 y 7,4.

Se sometió a los segmentos de aorta a una tensión de 1,5 g, que se fue reajustando durante 45 minutos hasta su estabilización. Una vez estabilizados los segmentos arteriales, se incubaron con una solución de KCl 75 mM hasta que se alcanzó la contracción máxima. El valor obtenido representó el 100% de la contracción de cada segmento. A fin de asegurar que el agente vasoconstrictor se había retirado de la preparación, se realizaron tres lavados con la solución KH. Una vez que los segmentos se estabilizaron de nuevo, se procedió a realizar las distintas curvas concentración-respuesta. Al igual que antes, después de cada curva se lavaron 3 veces los segmentos con la solución de KH y se dejó un tiempo de estabilización de 30 minutos para asegurar que el efecto observado en la nueva curva no se debía a los agentes utilizados previamente.

Los resultados de contracción se expresaron como porcentaje de contracción respecto al efecto contráctil máximo obtenido con KCl 75 mM y los de relajación se expresaron como porcentaje de relajación respecto a la contracción obtenida con noradrenalina (NA) 10^{-7} M.

5.1.1 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD RELAJANTE DEPENDIENTE DE ENDOTELIO

Se realizó una curva dosis-respuesta a acetilcolina (ACh 10^{-9} M-ACh 10^{-4} M) en los segmentos previamente contraídos con NA 10^{-7} M. Para determinar la contribución del NO en la relajación dependiente de endotelio se realizaron curvas a ACh, en presencia de N^G-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME, 10^{-4} M), inhibidor no selectivo de la NOS. Para determinar la contribución de los prostanoideos, se realizó una incubación con indometacina (indo, 3×10^{-6} M), inhibidor de la COX. Las incubaciones con los inhibidores se hicieron 20 minutos antes de realizar la curva dosis-respuesta a ACh.

5.1.2 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD RELAJANTE INDEPENDIENTE DE ENDOTELIO

Se realizó una curva dosis-respuesta a nitroprusiato sódico (NPS 10^{-12} - 10^{-5} M) en los segmentos previamente contraídos con NA 10^{-7} M.

5.1.3 PREPARACIÓN DE FÁRMACOS UTILIZADOS EN LOS ESTUDIOS DE FUNCIÓN VASCULAR

La ACh y el L-NAME (Sigma Aldrich) se prepararon en una solución de NaCl al 0,9%; el KCl (Sigma Aldrich); la indometacina (indo; Sigma Aldrich) se disolvió en una solución de bicarbonato sódico al 5%; el NPS y la NA (Sigma Aldrich) se prepararon en una solución de salino-ascórbico (0,9% NaCl y 0,01% ácido ascórbico). Se preparó una solución madre para cada uno de ellos que se conservó en alícuotas a -20°C hasta su utilización. A partir de ellas, se prepararon las soluciones necesarias para cada experimento.

5.2 ESTUDIO DE MICROSCOPIA CONFOCAL DE FLUORESCENCIA

5.2.1 DETERMINACIÓN DE LA BIODISPONIBILIDAD DE ANIÓN SUPERÓXIDO MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL EN AORTA TORÁCICA

Los segmentos arteriales de aorta torácica se estabilizaron durante 15 minutos en una solución KH a 37°C , constantemente burbujeada con carbógeno (95 % O_2 y un 5 % CO_2). Transcurrido este tiempo se añadió dihidroetidio (DHE, 3×10^{-6} M) y se incubó durante 30 minutos en oscuridad para evitar la pérdida de fluorescencia de la molécula. El DHE en

presencia de $O_2^{\cdot -}$ se oxida formando bromuro de etidio, que es capaz de intercalarse en el ADN formando un complejo que emite fluorescencia roja (longitud de onda de excitación 490 nm y de emisión 610 nm) tras excitarse. La intensidad de la fluorescencia que se observa es directamente proporcional a la cantidad de $O_2^{\cdot -}$ disponible en la muestra.

Tras la incubación, se lavaron los segmentos arteriales dos veces en una placa de 48 pocillos durante 15 minutos, se fijaron en una solución de paraformaldehído (PFA) al 4% para mantener la estructura del vaso y se guardaron a 4°C en oscuridad hasta su montaje para el estudio de microscopía confocal.

Con ayuda de una lente binocular (Leica GZ4) se realizaron cortes verticales de 0,5 mm de los segmentos arteriales previamente fijados. Los anillos así obtenidos se colocaron en una placa de 96 pocillos y se procedió a la tinción de los núcleos de las células del vaso mediante la incubación con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, 1:500; Molecular Probes) durante 15 minutos. El DAPI es un compuesto capaz de unirse a las regiones Adenina-Timina del ADN de las células produciendo la emisión de una fluorescencia azul (longitud de onda de excitación 405 nm y de emisión 410-475 nm). Tras la incubación se realizaron dos lavados de 10 minutos en tampón fosfato salino (PBS). Una vez teñidos los núcleos celulares, los anillos se colocaron en pocillos de silicona. Como medio de montaje se utilizó Citifluor AF-2 (Citifluor LTD) para evitar la pérdida de la fluorescencia al contacto con la luz. Las muestras se guardaron montadas a 4°C y en oscuridad hasta su visualización en un microscopio confocal (Leica modelo TCS SP2) acoplado a un microscopio invertido con fuentes de láser de argón y de helio-neón.

6 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE MARCADORES DE MATRIZ EXTRACELULAR

Se determinó mediante ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas o ELISA la concentración de distintos marcadores de síntesis o degradación de MEC, como el colágeno tipo IV (Collagen IV ELISA Kit, Echelon) en plasma, como indicador de la degradación de dicha molécula en tejido; la concentración de propéptido C-terminal de procólágeno I (PICP; PICP ELISA Kit, USCN) como indicador de la síntesis de colágeno; la concentración de desmosina (Human Desmosine ELISA kit, Cusabio) que es un metabolito de la degradación de elastina y la concentración de heparanasa, enzima encargada de la hidrólisis de los residuos de heparán sulfato (Heparanase ELISA Kit, USCN).

Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos previamente tapizados con un anticuerpo monoclonal específico para cada una de las proteínas a determinar, al que se unió la proteína estudiada presente en las muestras. Las muestras se diluyeron siguiendo las instrucciones del fabricante y se incubaron a 37°C para favorecer la unión anticuerpo/proteína. A fin de retirar la muestra no unida al anticuerpo se lavaron los pocillos. Posteriormente se añadió la solución que contenía un anticuerpo policlonal específico para la proteína de estudio unido a la enzima y se incubó de nuevo durante 1 hora, a 37°C para favorecer la unión. Se lavaron los pocillos para retirar el exceso de reactivo y se añadió la solución que contenía el sustrato de dicha enzima, de esta manera, se produjo un metabolito coloreado, cuya absorbancia se midió a 450 nm (ELx808; Bio-Tek). La absorbancia así medida es proporcional a la concentración de la proteína de estudio en la muestra problema.

La concentración de la proteína de estudio presente en las muestras se determinó utilizando la absorbancia de la curva patrón de cada una de las proteínas estudiadas, de concentración conocida proporcionada en el kit.

7 ESTUDIO DE LAS METALOPROTEASAS DE MATRIZ EXTRACELULAR

7.1 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE MMP2 Y MMP9 MEDIANTE ELISA

La concentración de MMP2 y MMP9 total en plasma de pacientes se determinó mediante un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas o ELISA utilizando un kit comercial (Quantikine® ELISA, R&D Systems).

El ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos previamente tapizados con un anticuerpo monoclonal anti-MMP2 o anti-MMP9 al que se unió la MMP correspondiente contenida en las muestras. Las muestras se diluyeron siguiendo las instrucciones del fabricante y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente en agitación (Agitador horizontal 3005, GFL). La muestra no unida al anticuerpo se retiró mediante 4 lavados. Se añadió el anticuerpo policlonal específico para la MMP2 o MMP9 unido a su vez a una enzima y se repitió la incubación en las mismas condiciones. Se realizaron cuatro lavados para retirar el exceso de reactivo y se añadió la solución que contenía el sustrato de dicha enzima, de esta manera, se generó un metabolito coloreado de forma proporcional a la concentración de MMP2 y MMP9 contenido en la muestra, cuya absorbancia se midió a 450 nm (ELx808; Bio-Tek). La concentración de MMP2 y de MMP9 presente en las muestras se determinó utilizando la absorbancia de la curva patrón concentración conocida (0,5ng/mL-32ng/mL para MMP2 y 0,313 ng/mL-20 ng/mL para MMP9) proporcionada en el kit.

7.2 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE MMP2 ACTIVA Y DE MMP9 ACTIVA MEDIANTE INMUNOENSAYO

La determinación de la concentración de MMP2 y MMP9 activas en las muestras de plasma de pacientes se realizó utilizando un kit comercial (QuickZyme Human MMP2/9 activity assay, QuickZyme Biosciences). Como se muestra en la figura 16, este ensayo se basa en la unión de la metaloproteasa contenida en la muestra específicamente a un anticuerpo anti-MMP2/9. A este complejo se añade un sustrato peptídico que es susceptible de sufrir proteólisis por la acción de la metaloproteasa, siempre y cuando ésta esté activa. Esta proteólisis dará lugar a un producto coloreado de forma proporcional a la cantidad de MMP activa en la muestra. La diferencia con un ELISA convencional radica en que en este caso, es la propia MMP la que mediante su actividad proteolítica es capaz de generar un producto coloreado.

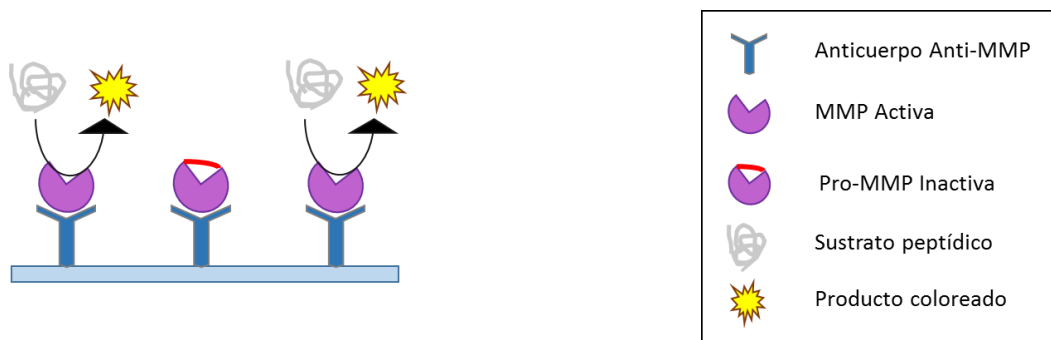


Figura 16. Esquema representativo del inmunoensayo para la determinación de actividad de MMP (QuickZyme activity assay; QuickZyme Bioscience).

El ensayo se realizó en una placa de 96 pocillos tapizados con un anticuerpo específico anti-MMP9 o anti-MMP2. La muestra de plasma se diluyó siguiendo las instrucciones del kit (1:30 para MMP9 y 1:70 para MMP2) y se añadió a la placa. Se realizó una incubación de 12 horas a una temperatura comprendida entre 2-8°C. Transcurrido este tiempo se realizaron 4 lavados para eliminar la muestra no unida al anticuerpo y se añadió la solución que contenía el sustrato de la MMP y en el caso de la MMP9 se realizó una incubación de 90 minutos, a 37°C. Se realizó una lectura de las placas a 405nm (ELx808; Bio-Tek), esta lectura se toma como tiempo=0 para realizar los posteriores cálculos. Seguidamente se incubó la placa a 37°C para favorecer la actividad de las proteasas durante 24 horas, tras este tiempo se realizó la lectura de la placa para obtener el valor de absorbancia en las mismas condiciones que la vez anterior.

El valor de absorbancia obtenido en los distintos tiempos se restó al valor en tiempo=0 y la concentración de proteína activa en la muestra se obtuvo a partir de una curva patrón de MMP2 o MMP9 de concentración conocida (0,008; 0,016; 0,031; 0,062; 0,125; 0,25; 0,5 ng/mL) proporcionada en el kit.

7.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD GELATINASA DE MMP2 Y MMP9 MEDIANTE ZIMOGRAFÍA EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Este ensayo se realizó en muestras de plasma tanto de pacientes como de ratas y en homogenizado de riñón de rata. El riñón de los animales se homogenizó en un tampón de homogenización (Tris-HCl 50mM, pH 7.4; NaCl 150mM, Nonidet 1%, inhibidor de proteasas 1% (Sigma-Aldrich, España).

La zimografía en gel es una técnica utilizada para el análisis de la actividad de las MMPs. Se basa en la separación en geles de poliacrilamida, de las proteínas contenidas en una muestra a través de una electroforesis en condiciones desnaturalizantes (en presencia de SDS) pero no reductoras (a las muestras no se les añade β -mercaptoetanol). El gel de electroforesis en el que se realiza la separación de las proteínas contiene el sustrato de las metaloproteasas que en el caso tanto de la MMP9, como de la MMP2, es gelatina. Las proteínas presentes en las muestras, tanto de plasma como de riñón, se separaron mediante electroforesis utilizando un sistema Mini Protean Tetra System (Bio-Rad). Se igualó la concentración de proteínas presentes en las muestras y tras la adición del reactivo Laemmli (BioRad) en una proporción 1:1 se incubaron durante 15 minutos, a 37°C. Las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida al 10% [H₂O (7,9 mL); gelatina (0,1%); acrilamida/bisacrilamida al 30% (6,6 mL); 1,5M Tris-HCl, pH=8,8 (5 mL); SDS al 20% (200 μ L); persulfato amónico al 10% (200 μ L), TEMED (N,N,N',N'-Tetrametiltlenodiamina; 10 μ L)]. Como marcador de peso molecular se utilizó Precision Plus ProteinTM, All Blue Standard (BIO-RAD). La electroforesis se realizó a 150 V durante 120 minutos a temperatura ambiente y en tampón de electroforesis (0,2 M glicina; 0,1 M Tris y 1% SDS; pH=8,3).

Posteriormente los geles se lavaron dos veces con agua destilada durante 15 minutos cada vez y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en tampón de activación enzimática (Tris 50 mM; CaCl₂ 6 mM; pH=7,4) con un detergente no iónico como el Tritón (Tritón X-100; Sigma) para eliminar el SDS y renaturalizar a las gelatinasas, para favorecer su actividad. Transcurrido este tiempo los geles se volvieron a incubar en el tampón de activación (sin tritón) durante 24 horas, a 37°C para favorecer que las MMPs degraden la gelatina contenida en el gel. Al día siguiente, los geles se tiñeron con azul Coomassie R-250 (Bio-Rad).

Posteriormente se procedió al desteñido de los mismos por inmersión en un tampón de desteñido (metanol 40% y ácido acético 10%). Se realizaron dos desteñidos de 1 minuto cada uno. Esto permite la aparición de unas bandas claras en contraste con el azul del gel, correspondientes a la gelatina degradada, que indica la actividad gelatinasa de las MMPs, de tal manera que cuanto mayor sea la banda generada, mayor será la actividad gelatinasa de la MMP en la muestra. Al realizar el desteñido se pueden observar las bandas correspondientes a los distintos estados de activación de las MMPs. Se puede observar la actividad tanto de MMP2 activa (62 KDa) y de la proenzima pro-MMP2 (72 KDa), como de la MMP9 en su forma activa (82 KDa), glicosilada (85 KDa) y de la proenzima pro-MMP9 (92KDa). La MMP se mantiene inactiva gracias a que el propéptido de su forma de zimógeno bloquea su centro activo mediante la formación de un puente de cisteína con el átomo de Zn^{2+} del centro activo. El SDS utilizado durante la electroforesis es capaz de romper este puente de cisteína, dejando al descubierto el centro activo y permitiendo así su activación, pero no es capaz de escindir completamente el propéptido de la proteasa, por lo tanto la MMP conserva el peso molecular de su forma inactiva (Springman y cols., 1990). Los geles se dejaron en una solución de stop (10% ácido acético) hasta el análisis de las bandas obtenidas por densitometría, utilizando el software de análisis de imagen ImageJ.

7.4 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS TIMP1, pro-MMP9, MMP9 Y NOX5 MEDIANTE WESTERN BLOT

La expresión de TIMP1 (29 KDa) en plasma de pacientes y la expresión de pro-MMP9 (92 KDa), MMP9 (82KDa) y NOX5 (86 KDa) contenidas en las micropartículas extraídas de plasma de pacientes (ver sección 10.4) se determinaron mediante Western Blot.

Las proteínas presentes en las muestras se separaron mediante electroforesis de la misma forma que en la técnica de zimografía, utilizando un sistema Mini Protean Tetra System (Bio-Rad). Una vez igualada la concentración de proteínas de las muestras, se añadió a cada una de las muestras una mezcla de reactivo de Laemmli con β -mercaptoetanol (Sigma) y se hirvieron en un baño a 90°C, durante 5 min. Se cargaron en un gel con un porcentaje de acrilamida distinto en función del peso molecular de la proteína a detectar. Para TIMP1 se utilizó al 12% [H_2O (6,5 ml); acrilamida/bisacrilamida al 30% (8 mL); 1,5M Tris-HCl pH=8,8 (5 mL); SDS al 20% (200 μ L); persulfato amónico al 10% (200 μ L), TEMED (N,N,N',N'-tetrametiltilendiamina; 10 μ L)]. Para MMP9, pro-MMP9 y NOX5, se utilizó el gel de acrilamida al 10% [H_2O (7,9 mL); acrilamida/bisacrilamida al 30% (6,6 mL); 1,5M Tris-HCl, pH=8,8 (5 mL); SDS al 20% (200 μ L); persulfato amónico al 10% (200 μ L), TEMED (N,N,N',N'- Tetrametiltilendiamina; 10 μ L)]. Como

marcador de peso molecular se utilizó Precision Plus Protein™, All Blue Standard (BIO-RAD). En el caso de la determinación de NOX5 se utilizó un homogenizado de riñón humano como control positivo y como control negativo un homogenizado de riñón de rata, donde no se expresa NOX5.

La electroforesis se realizó en condiciones reductoras y desnaturizantes a 150 V, durante 120 min, a temperatura ambiente y en un tampón de electroforesis (0,2 M glicina; 0,1 M Tris y 1% SDS; pH=8,3). A continuación, se llevó a cabo la transferencia de las proteínas del gel a una membrana de polifluoruro de vinilideno con un tamaño de poro de 0,45 µm, a través de la preparación de un sándwich de transferencia, a 200 miliAmperios, durante 90 minutos (Mini Trans-Blot® cell, Bio-Rad) en buffer de transferencia [20% metanol, 20% tampón húmedo (125 mM Tris; 0,96 M Glicina)] a 4°C.

Una vez realizada la transferencia, y con el fin de evitar uniones inespecíficas, se incubaron las membranas durante 1 hora en agitación con una solución de bloqueo [5% leche en polvo desnatada en TBS-T (1 M Tris; 3 M NaCl; 0,1% Tween 20; pH=7.4)]. Posteriormente, se incubaron las membranas a 4°C con el anticuerpo primario específico para cada proteína. Como anticuerpo primario contra TIMP1 se utilizó un anticuerpo policlonal de conejo (1:500, Thermo Scientific, EE.UU.). Como anticuerpo primario contra MMP9 y pro-MMP9 se utilizó un anticuerpo policlonal (1:1000, Abcam). Y como anticuerpo primario contra NOX 5, se utilizó un anticuerpo policlonal (1:1000, Sigma-Aldrich) preparados todos en la solución de bloqueo.

Al día siguiente, se lavaron las membranas durante 15 minutos en TBS-T (*Tris-buffered saline con Tween 20*) y se incubaron durante 90 minutos, a temperatura ambiente y en agitación con el anticuerpo secundario. Para todas las proteínas se utilizó un anticuerpo (IgG) anti-conejo marcado con peroxidasa (1:2000, Santa Cruz Biotechnology) preparado en TBS-T.

Seguidamente, se lavaron de nuevo las membranas 5 veces (un lavado de 15 minutos y 4 lavados de 5 minutos cada uno) con TBS-T, para eliminar los restos del anticuerpo secundario. La detección de las distintas proteínas se realizó por quimioluminiscencia, mediante la adición del sustrato de la peroxidasa (*ECL Prime Western Blot detection reagent*, Amersham Bioscience, Reino Unido) y posterior exposición a una película de revelado (Amersham Hyperfilm ECL, Amersham Bioscience, Reino Unido) durante el tiempo requerido por cada proteína.

La cuantificación se realizó mediante densitometría óptica de las bandas correspondientes a la proteína de estudio mediante el programa informático ImageJ. Para realizar un control de carga, se realizó una tinción con Ponceau S. (ácido 3-hidroxi-4-[2-sulfo-4-(4-sulfofenilazo)-

fenilazo]-2,7-naftalendisulfónico), este reactivo se une tanto a los grupos amino cargados positivamente como de forma no covalente a las regiones no polares de las proteínas, tiñéndolas de color rojo. Las membranas se tiñeron con Ponceau S (Panreac) al 0,1 % en una solución al 5% de ácido acético. La tinción se llevó a cabo durante 5 minutos, transcurridos los cuales se realizaron dos lavados con agua destilada, de 5 minutos cada uno, para retirar el exceso de reactivo. Los resultados se expresaron como porcentaje respecto al grupo control de pacientes normoalbuminúricos.

8 ESTUDIO DE PARÁMETROS DE ESTRÉS OXIDATIVO EN MODELOS EXPERIMENTALES Y EN PACIENTES

8.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD NADPH OXIDASA EN RIÑÓN

La actividad de la NADPH oxidasa se determinó en riñón de rata por la quimioluminiscencia producida por la lucigenina en presencia de NADPH (Guzik y Chanon, 2005). Para ello, se homogenizaron los riñones en tampón Hepes (100mM NaCl; 4,7mM KCl; 2mM CaCl₂; 25mM NaHCO₃; 1mM KH₂PO₄; 1,2mM MgSO₄; 20mM Hepes; 11mM glucosa; pH=7,4). Una vez obtenidas las muestras, se prepararon inmediatamente los tubos del luminómetro con 1 mL de tampón Hepes y los sustratos necesarios: lucigenina (0,5 mM; Sigma-Aldrich) y NADPH (30 mM, Sigma-Aldrich). Éstos se mantuvieron en hielo hasta el momento de llevar a cabo la reacción. El ensayo se realizó siguiendo el siguiente esquema:

Tabla 6. Esquema seguido para realizar el ensayo de detección de la actividad de NADPH oxidasa en riñón

	tampón Hepes	NADPH	lucigenina	muestra
Blanco	1 mL	---	1 µL	---
Cuantos basales con riñón	1 mL	---	1 µL	10 µL
Cuantos estimulados con riñón	1 mL	10 µL	1 µL	10 µL

La actividad NADPH oxidasa se evaluó determinando la emisión de luz de los homogenizados de riñón en presencia de lucigenina y de NADPH en un luminómetro (Berthold detection system SIRIUS) a temperatura ambiente. Se midió la emisión de luz (en cuantos o fotones) durante 5 min, realizando medidas cada 30 segundos. La actividad de la NADPH oxidasa se calculó mediante la siguiente fórmula:

Actividad NADPH oxidasa = [(cuantos estimulados - blanco) - (cuantos basales - blanco)] / mg de proteína.

8.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD SOD TOTAL EN RIÑÓN

La actividad SOD total se determinó en un homogenizado de riñón de rata. Los riñones se homogenizaron en un tampón fosfato potásico 50 mM (pH=7,4) e inmediatamente se determinó la actividad de la SOD. El ensayo se basa en la capacidad de la SOD para inhibir la reacción de reducción del citocromo c oxidado por el $O_2^{\cdot-}$ (figura 17). Como fuente de $O_2^{\cdot-}$ se utiliza la descomposición catalítica de la xantina por parte de la xantina oxidasa (Kuthan y cols., 1986).

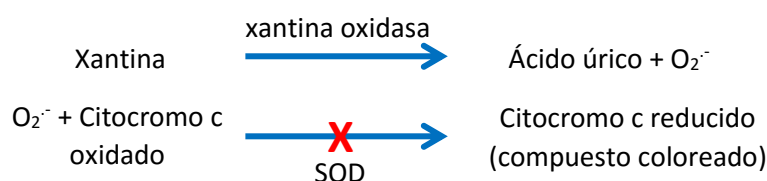


Figura 17: Fundamento del ensayo de determinación de la actividad de la superóxido dismutasa (SOD).

El citocromo c reducido es un producto coloreado cuya absorbancia puede determinarse a 546 nm. En el ensayo se tomaron 50 μ l del sobrenadante de cada una de las muestras, a los que se añadió 1 mL de tampón fosfato potásico (0,05 M; pH=7,8) con EDTA (0,1 mM). Posteriormente, se añadieron 250 μ l de xantina (0,5 Mm; Sigma-Aldrich) y 50 μ L de citocromo c (0,1 mM; Sigma-Aldrich). La reacción comienza tras la adición de la xantina oxidasa (0,5 U/mL; Sigma-Aldrich), momento a partir del cual se monitoriza la reacción durante 1 minuto en un espectrofotómetro (Beckman DU 640). Los resultados se expresaron en función de la cantidad de proteína de cada muestra.

8.3 DETERMINACIÓN DE LA OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

La formación de grupos carbonilos en los aminoácidos que forman las proteínas se considera un marcador de oxidación. La concentración de carbonilos unidos a proteína se puede determinar gracias a la reacción que se produce entre los carbonilos con el compuesto 2,4-dinitrofenilhidracina (DNPH) para dar la correspondiente hidrazona (figura 18). De esta manera, se forma un producto de color amarillo, que puede cuantificarse por espectrofotometría a 370 nm.

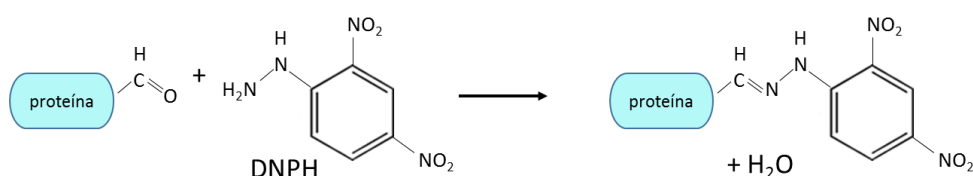


Figura 18. Esquema de la reacción entre el grupo carbonilo unido a una proteína y el compuesto DNPH para dar como producto la correspondiente hidrazona de color amarillo. Imagen modificada de Hawkins y cols., 2009.

Para realizar el ensayo se incubaron 25 µL de muestra de plasma de pacientes en el cual se había igualado previamente la concentración de proteínas, con 25 µL de DNPH (10 mM) en tubos eppendorf, durante 15 minutos. Posteriormente, se añadieron 50 µL de TCA (ácido tricloroacético; 20 % p/v) y se incubó durante 30 minutos, a 4°C. Transcurrido este tiempo, se realizó una centrifugación a 12000 rpm, durante 30 minutos, a 4°C. Tras descartar el sobrenadante, se lavó el precipitado con 200 µL de una mezcla etanol/etilacetato (1:1 v/v) y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones que la vez anterior. Posteriormente se añadieron al precipitado 50 µL de una solución de guanidina-HCl (6 M) y se incubó a temperatura ambiente durante 45 minutos para favorecer la solubilización del precipitado. Una vez transcurrido este tiempo, se transfirió todo el volumen a una placa de 96 pocillos y se determinó la absorbancia a 370 nm (ELx808; Bio-Tek). La concentración de carbonilos en la muestra se determinó gracias al coeficiente de extinción molar del DNPH ($\epsilon=22000\text{M/cm}$) utilizando la siguiente fórmula:

$$[\text{Carbonilos}] = \text{Absorbancia} \cdot 10^6 / \epsilon \cdot H$$

Donde H es el valor de la altura que ocupa el volumen final del ensayo en el correspondiente pocillo de la placa donde se determinará la absorbancia.

8.4 DETERMINACIÓN DE LA OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS POR WESTERN BLOT

Para determinar la oxidación de las proteínas plasmáticas de pacientes, se realizó la derivatización de las muestras de plasma de los pacientes con DNPH como se indica en la sección anterior. De esta manera, utilizando un anticuerpo contra DNPH se pueden detectar las proteínas oxidadas mediante *Western Blot* (Hawkins y cols., 2009). Seguidamente, se añadió una mezcla de laemmli con β -mercaptoetanol en una proporción 1:1, y se hirvieron las muestras durante 5 minutos, a 95°C, para desnaturalizar las proteínas.

Las muestras así tratadas se cargaron en geles de acrilamida al 12% siguiendo el procedimiento explicado en la sección 7.4. Como anticuerpo primario se utilizó el anticuerpo policlonal de conejo contra DNP (1:1000, Thermo Scientific) y como anticuerpo secundario un anticuerpo (IgG) anti-conejo marcado con la enzima peroxidasa (1:2000, Santa Cruz Biotechnology). Los resultados se expresaron como porcentaje respecto al grupo control de pacientes normoalbuminúricos.

8.5 DETERMINACIÓN DEL TIMP1 OXIDADO MEDIANTE INMUNOPRECIPITACIÓN

Para determinar la oxidación del inhibidor de la MMP9, TIMP1, en plasma de pacientes, se realizó la inmunoprecipitación del mismo seguida de una derivatización del inhibidor con DNPH (Sigma-Aldrich).

La técnica de inmunoprecipitación consiste en la separación de la proteína de interés de una mezcla que contenga otras muchas proteínas. Para ello se realiza la incubación de la muestra con un anticuerpo específico para la proteína de estudio, junto con una fase sólida formada por proteína A (procedente de *Staphylococcus aureus*) y proteína G (procedente de *Escherichia coli*) inmovilizadas en perlas de sefarosa. Tanto la proteína A como la G tienen gran afinidad por la región Fc del anticuerpo, y por lo tanto se unirán al complejo anticuerpo-proteína. De esta manera, mediante centrifugación se puede separar la proteína de estudio del resto de proteínas de la muestra.

Para eliminar las uniones proteicas inespecíficas, se realizó un prelavado añadiendo en exceso proteína A y proteína G inmovilizadas en las perlas de sefarosa a 1 mg de proteína total de cada muestra. Tras la centrifugación y el descarte del precipitado, se añadió al sobrenadante el anticuerpo específico para la proteína TIMP1 y de nuevo exceso de proteína A y proteína G. Se incubó durante 24 horas, a 4°C y en agitación para favorecer la unión. Al día siguiente se centrifugó y se descartó el sobrenadante. Se realizaron 3 lavados con una solución de Tris (10 mM, pH=7,4) a la que se añadieron inhibidores de proteasas (1µL/mL leupeptina, 1µL/mL aprotinina y 0,5µL/mL N-α-p-tosil-l-lisina en clorometilcetona). Tras el último lavado, se derivatizó la muestra mediante una incubación de 15 minutos, con 20 µM DNPH. Posteriormente se centrifugó, se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en reactivo de laemmli (Biorad). Seguidamente, se hirvió durante 5 minutos, a 95°C, para separar las perlas de sefarosa de la proteína de estudio.

Las muestras así tratadas se cargaron en geles de acrilamida al 12%. Como anticuerpo primario se utilizó un anticuerpo policlonal de conejo contra DNP (1:1000, Thermo Scientific) y como anticuerpo secundario un anticuerpo (IgG) anti-conejo marcado con la enzima peroxidasa (1:2000, Santa Cruz Biotechnology). Para realizar el control de carga se incubó la membrana con el anticuerpo contra TIMP1 (ver sección 7.4 del material y métodos). La cuantificación se llevó a cabo estableciendo la relación entre DNP/TIMP1. Los resultados se expresaron como porcentaje respecto al grupo control de pacientes normoalbuminúricos.

9 ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN PROTEICA MMP9/TIMP1 UTILIZANDO LA TECNOLOGÍA Alpha-LISA

9.1 FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

La tecnología Alpha-LISA, desarrollada por PerkinElmer®, permite el estudio de interacciones entre moléculas en placa de 96 pocillos. Este ensayo permite el estudio de la interacción de una gran variedad de parejas moleculares, por ejemplo, proteína/proteína, proteína/ADN, proteína/RNA, proteína/carbohidrato, etc. Además, al no requerir pasos intermedios de lavado, permite medir interacciones en muestras en las que las moléculas de estudio se hallen a bajas concentraciones (Beaudet y cols., 2008).

En el caso de la detección de interacciones proteína/proteína, una de las proteínas se une a una microperla donadora, y la otra a una microperla aceptora. Si existe interacción entre las dos proteínas, la excitación de la microperla donadora producirá a su vez la excitación de la microperla aceptora y la emisión por parte de esta última, de una señal detectable por un luminómetro que será directamente proporcional a la interacción existente en la muestra.

Las microperlas donadoras están tapizadas con una molécula llamada ftalocianina, que cuando se excita con una longitud de onda de 680 nm es capaz de convertir el oxígeno molecular (O_2) en oxígeno singlete (1O_2). Éste difunde a una distancia máxima de 200 nm en solución, si la microperla aceptora (cuyo fluoróforo es europio) unida a la segunda molécula se encuentra dentro de esa distancia, es decir, si existe interacción entre las moléculas de estudio, se excitará y producirá una emisión a una longitud de onda de 615 nm.

9.2 PROTOCOLO Y VALIDACIÓN DEL ENSAYO

9.2.1 CONJUGACIÓN DE LAS MICROPERLAS ACEPTORAS

Las microperlas aceptoras se conjugaron con el anticuerpo contra MMP9 (Fisher Scientific), para ello se realizó una incubación de las microperlas durante 24 horas con el anticuerpo contra MMP9 en un tampón de conjugación (10% Tween-20, $NaBH_3CN$ 400 mM, Hepes 100 mM; pH=7,4) a 37°C y en agitación. Al día siguiente se incubó durante 1 hora, a 37°C, con una solución de carboximetoxilamina (Sigma-Aldrich) en NaOH (800mM) para bloquear los espacios de las microperlas aceptoras que quedaron libres. Seguidamente, se realizaron 3 lavados con Tris-HCl (100 mM, pH=8), entre los cuales se sonicó la solución para evitar la aglomeración de las microperlas entre sí. Después de cada sonicación se centrifugó a 16000 g, durante 15 minutos, a 4°C. Tras la última centrifugación se resuspendió el precipitado en una solución de almacenamiento (PBS, 0,05% Proclin-300) y se guardó a 4°C hasta su uso.

9.2.2 INTERACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

La validación del ensayo de alpha-LISA para determinar la interacción entre MMP9 y su inhibidor TIMP1 se llevó a cabo utilizando proteínas recombinantes humanas (TIMP1, Sigma-Aldrich; MMP9, Life Technologies). Se utilizaron concentraciones crecientes de ambas proteínas desde 0 hasta 20 µg/mL que se cargaron en una placa opaca de 96 pocillos de la siguiente manera (tabla 7)

Tabla 7. Esquema de la titulación MMP9/TIMP1 para la puesta a punto del ensayo.

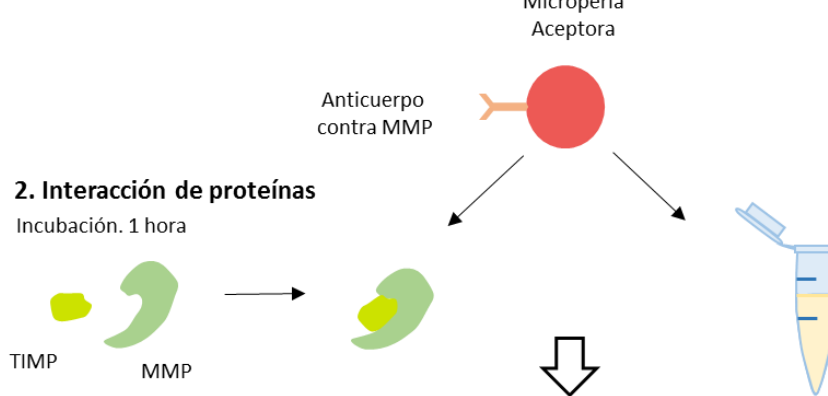
0 µg/mL TIMP	0 µg/mL TIMP	0 µg/mL TIMP	0 µg/mL TIMP	0 µg/mL TIMP	0 µg/mL TIMP
0 µg/mL MMP	0,3 µg/mL MMP	1 µg/mL MMP	3 µg/mL MMP	10 µg/mL MMP	20 µg/mL MMP
0,3 µg/mL TIMP	0,3 µg/mL TIMP	0,3 µg/mL TIMP	0,3 µg/mL TIMP	0,3 µg/mL TIMP	0,3 µg/mL TIMP
0 µg/mL MMP	0,3 µg/mL MMP	1 µg/mL MMP	3 µg/mL MMP	10 µg/mL MMP	20 µg/mL MMP
1 µg/mL TIMP	1 µg/mL TIMP	1 µg/mL TIMP	1 µg/mL TIMP	1 µg/mL TIMP	1 µg/mL TIMP
0 µg/mL MMP	0,3 µg/mL MMP	1 µg/mL MMP	3 µg/mL MMP	10 µg/mL MMP	20 µg/mL MMP
3 µg/mL TIMP	3 µg/mL TIMP	3 µg/mL TIMP	3 µg/mL TIMP	3 µg/mL TIMP	3 µg/mL TIMP
0 µg/mL MMP	0,3 µg/mL MMP	1 µg/mL MMP	3 µg/mL MMP	10 µg/mL MMP	20 µg/mL MMP
10 µg/mL TIMP	10 µg/mL TIMP	10 µg/mL TIMP	10 µg/mL TIMP	10 µg/mL TIMP	10 µg/mL TIMP
0 µg/mL MMP	0,3 µg/mL MMP	1 µg/mL MMP	3 µg/mL MMP	10 µg/mL MMP	20 µg/mL MMP
20 µg/mL TIMP	20 µg/mL TIMP	20 µg/mL TIMP	20 µg/mL TIMP	20 µg/mL TIMP	20 µg/mL TIMP
0 µg/mL MMP	0,3 µg/mL MMP	1 µg/mL MMP	3 µg/mL MMP	10 µg/mL MMP	20 µg/mL MMP

Se añadieron 5 µL de cada una de las diluciones de las proteínas recombinantes MMP9 y TIMP1 y se incubó durante una hora a temperatura ambiente para permitir la interacción entre las dos proteínas. Transcurrido este tiempo se añadieron a cada pocillo 10 µL de las microperlasceptoras unidas al anticuerpo contra MMP9 (10 µg/mL) y 10 µL de anticuerpo biotinilado contra TIMP1 (3 nM; ThermoScientific) y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente para favorecer la unión de cada proteína a su anticuerpo específico. Posteriormente, se añadieron 20 µL de microperlas donadoras tapizadas de estreptavidina (40 µg/mL), este recubrimiento permite la unión del anticuerpo biotinilado a la microperla donadora. Se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Una vez transcurrido ese tiempo, se determinó la intensidad de la señal de emisión a 615 nm (lector de placas EnSpire®).

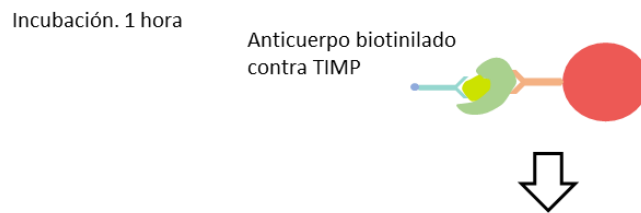
9.3 DETERMINACIÓN DE LA INTERACCIÓN MMP9/TIMP1 EN MUESTRAS DE PLASMA DE PACIENTES

Para realizar el ensayo se diluyeron 5 μ L de plasma en el cual, previamente se había igualado la concentración total de proteínas, con 5 μ L de tampón alpha-LISA (2,5 mM HEPES pH= 7,4; NaCl 100 mM; 0,1% BSA; 0,05% Tween-20), y se siguió el protocolo descrito anteriormente. En el siguiente esquema se detalla el protocolo seguido para la puesta a punto y realización de este ensayo (figura 19).

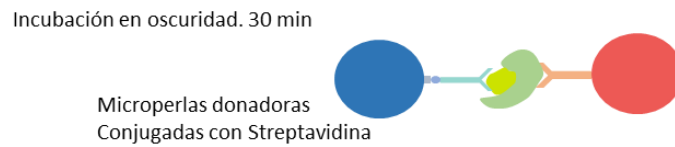
1. Conjugación



3. Adición del anticuerpo biotinilado contra TIMP



4. Adición de las microperlas donadoras conjugadas con Streptavidina



5. Lectura en EnSpire®

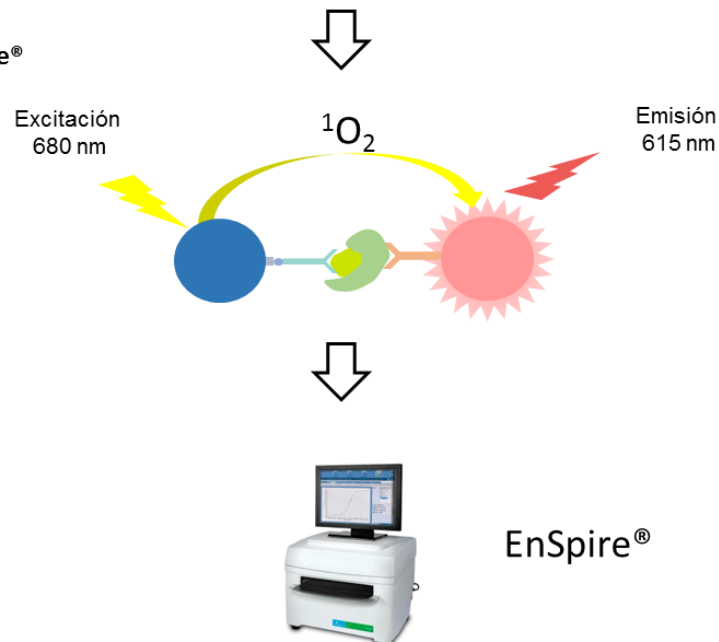


Figura 19. Esquema explicativo del protocolo para la determinación de la interacción entre dos proteínas mediante la técnica de AlphaLISA.

10 ESTUDIO DE MICROPARTÍCULAS CONTENIDAS EN EL PLASMA DE PACIENTES POR CITOMETRÍA DE FLUJO

10.1 FUNDAMENTO DE LA TÉCNICA

La citometría de flujo es una técnica de gran importancia tanto en la investigación básica como en la clínica. Permite la caracterización y cuantificación de poblaciones celulares en suspensión de manera individualizada, dando información de los distintos tipos celulares que componen la población y además permite el estudio de núcleos, cromosomas, mitocondrias y otras partículas subcelulares como cuerpos apoptóticos o micropartículas.

El fundamento de esta técnica se basa en la canalización de un flujo de células o partículas subcelulares, de una en una a través de una cánula. Sobre cada una de las células impacta un haz de luz generada por un láser, como resultado de este impacto se obtiene información sobre el tamaño y la complejidad de las células analizadas para poder así diferenciar distintas poblaciones y subpoblaciones, dentro de una población de células con el mismo tamaño. Además, la citometría de flujo permite identificar distintos tipos celulares mediante el marcaje de los antígenos presentes en la superficie celular, con anticuerpos conjugados con moléculas fluorescentes. El citómetro es capaz de detectar y analizar la fluorescencia emitida por las células marcadas. La fluorescencia se recoge por el detector correspondiente a su longitud de onda y se traduce en un pulso de voltaje, cuya intensidad es proporcional a la intensidad de fluorescencia de la célula y ésta a su vez a la cantidad de antígeno marcado presente en la misma (Barrera-Ramírez y cols., 2004).

10.2 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO TOTAL DE MICROPARTÍCULAS

Para proceder a la cuantificación del número de micropartículas contenidas en muestras de plasma de pacientes, se realizó una centrifugación del mismo a 4000 rpm, durante 20 minutos, a 4°C, con el fin de eliminar plaquetas y cuerpos apoptóticos. Seguidamente se recogió el sobrenadante, donde se encuentran las micropartículas.

Dado que las micropartículas son vesículas con un tamaño comprendido entre 0,1 y 1 µm, las soluciones utilizadas durante el desarrollo de estos experimentos se filtraron previamente a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,1 µm para evitar falsos positivos. Como blanco se utilizó una solución de NaCl 0,9 %. Como referencia de tamaño se utilizaron microesferas de 1 µm (ThermoFisher Scientific, Reino Unido), disueltas en una solución de NaCl al 0,9 %, de tal manera, que las posibles micropartículas formarían parte de los eventos detectados por debajo de esta población.

Para determinar los eventos de menos de 1 μm como micropartículas, se realizó un marcaje con anexina V. Para ello se incubaron 10 μL del sobrenadante obtenido del plasma como se indica anteriormente con 2,5 μL de anexina-V Alexa 647 (BD Pharmingen). La anexina se unirá a los residuos de fosfatidilserina presentes en las membranas de las micropartículas. Se añadió 1 μL de CaCl_2 (0,5 M) a la muestra ya que se requiere la presencia de calcio para que se produzca la externalización de las moléculas de fosfatidilserina. Como control negativo se realizó el mismo marcaje con anexina V, pero en ausencia de calcio.

La muestra se inyectó a flujo medio durante 1 minuto. Se analizó el número de micropartículas positivas para cada marcaje utilizando el software de análisis Summit 4.3. Para realizar la cuantificación se utilizó una solución de NaCl 0,9% que contenía una concentración conocida de microesferas de 3 μm (1×10^7 microesferas en 1 mL; *Rainbow calibration particles* 3-3,4 μm ; Biolegend).

10.3 DETERMINACIÓN DE LA PROCEDENCIA DE LAS MICROPARTÍCULAS

Cada tipo celular expresa en la membrana unos determinados anticuerpos de manera específica. Dado que las micropartículas se generan a partir de la membrana celular, comparten estos anticuerpos, por lo tanto, un marcaje de los mismos permitirá determinar el tipo celular del que proceden las micropartículas.

Se estudió si las micropartículas plasmáticas procedían de CE utilizando un marcaje CD42 negativo (CD42b-FITC, dilución 1:10; BD Pharmingen), CD31 positivo (CD31-APC-Cy7, dilución 1:600; Biolegend) y de monocitos, utilizando un marcaje CD14 positivo (CD14-APC-Cy7, 1:50; BD Pharmingen). Como control negativo se utilizó la misma muestra de plasma de pacientes sin ningún tipo de marcaje.

Para llevar a cabo el experimento, se utilizaron 10 μL de sobrenadante obtenido de la centrifugación del plasma como se indica en el punto anterior, al cual se añadió NaCl 0,9% previamente filtrado hasta obtener un volumen final de 100 μL . A este volumen se añadieron los anticuerpos marcados con un fluorocromo, para obtener la correspondiente dilución y se inyectó la muestra a flujo medio durante 1 minuto. Se analizó el número de micropartículas positivas para cada marcaje utilizando el software de análisis Summit 4.3.

10.4 AISLAMIENTO DE MICROPARTÍCULAS

Para proceder al aislamiento de micropartículas en muestras de plasma se realizó una centrifugación en las mismas condiciones que para el estudio de citometría de flujo. Seguidamente se recogió el sobrenadante y se diluyó en PBS para aumentar la eficacia del aislamiento de las micropartículas al disminuir la viscosidad y la densidad del plasma. Para sedimentar las micropartículas se realizó otra centrifugación a 27000 rpm, durante 60 minutos, a 4°C. Se descartó el sobrenadante que contenía exosomas, pequeñas vesículas y factores solubles. El sedimento, en el que se encuentran las micropartículas, se resuspendió en 50 µL de PBS. Se procedió a la cuantificación de proteínas totales (ver sección 4.3 del material y métodos) de las muestras que se guardaron a -80°C hasta su utilización para estudios de Western Blot.

11 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos se expresaron como la media aritmética \pm el error estándar de la media aritmética (E.S.) para las variables continuas, las variables categóricas se expresaron como porcentaje. Aquellas variables que no siguieron una distribución normal se normalizaron utilizando una transformación logarítmica y se expresan como la mediana \pm el rango intercuartil. Las comparaciones de los resultados obtenidos entre grupos individuales se realizaron utilizando el test de la *t* de Student y el análisis de la varianza de una vía (1-ANOVA) o de dos vías (2-ANOVA) seguido del test de Newman-Keuls o de Bonferroni. Las correlaciones se estudiaron mediante el coeficiente de correlación de Pearson y su correspondiente *p* value. Se consideraron grupos significativamente distintos cuando $p < 0,05$. Para el análisis estadístico se utilizó el programa informático GraphPad Prism 5. La respuesta máxima (EMax) se calculó mediante análisis de regresión no lineal de cada curva concentración-respuesta. El área bajo la curva (ABC) se calculó para cada curva de forma independiente.

RESULTADOS

1 CARACTERIZACIÓN DE LAS RATAS MWF COMO MODELO EXPERIMENTAL DE DESARROLLO ESPONTÁNEO DE ALBUMINURIA

1.1 CARACTERIZACIÓN DEL MODELO ANIMAL

Como se observa en la tabla, las ratas Munich Wistar Frömter (MWF) a las 12 semanas de edad no mostraron diferencias significativas en el peso corporal ni en el cociente peso del corazón/peso corporal y presentaron una presión arterial sistólica (PAS) similar a la de los controles Wistar Kyoto (WKY). Sin embargo, las ratas MWF, presentaron un aumento significativo de la excreción urinaria de albúmina (tabla 8; $p<0,05$), acompañado de una disminución significativa del cociente del peso de los riñones/peso corporal (tabla 8; $p<0,05$). Se observó además, una disminución significativa en la concentración plasmática de 25-hidroxicolecalciferol en las ratas MWF en comparación con las ratas WKY (tabla 8; $p<0,001$).

Tabla 8. Caracterización de los modelos animales WKY y MWF. Los resultados se expresan como la media \pm E.S. $n=4-6$ (* $p<0,05$; *** $p<0,001$ respecto al grupo control).

Variable	WKY	MWF
Peso corporal (g)	282,4 \pm 4,9	302,6 \pm 4,3
Peso riñón/peso corporal (mg/g)	6,32 \pm 0,11	5,25 \pm 0,10*
Peso corazón/peso corporal (mg/g)	2,65 \pm 0,08	2,56 \pm 0,08
PAS (mmHg)	139 \pm 5	146 \pm 1
Excreción urinaria de albúmina (mg/24 h)	0,2 \pm 0,1	46,2 \pm 4,0*
25-hidroxicolecalciferol (ng/mL)	22,11 \pm 1,53	10,58 \pm 1,38***

1.2 DETERMINACIÓN DE LA FUNCIÓN VASCULAR EN AORTA TORÁCICA

Dado que la albuminuria se considera un marcador de daño endotelial a nivel renal que puede ser reflejo de un daño vascular generalizado (Segura y Ruilope, 2001), se estudió en este modelo animal la función vascular en aorta torácica aislada.

1.2.1 DETERMINACIÓN DE LA RESPUESTA CONTRÁCTIL

La respuesta contráctil a KCl (75mM), al igual que la respuesta contráctil a NA (10^{-7} M) (figura 20a y 20b respectivamente), no se modificó entre los modelos experimentales.

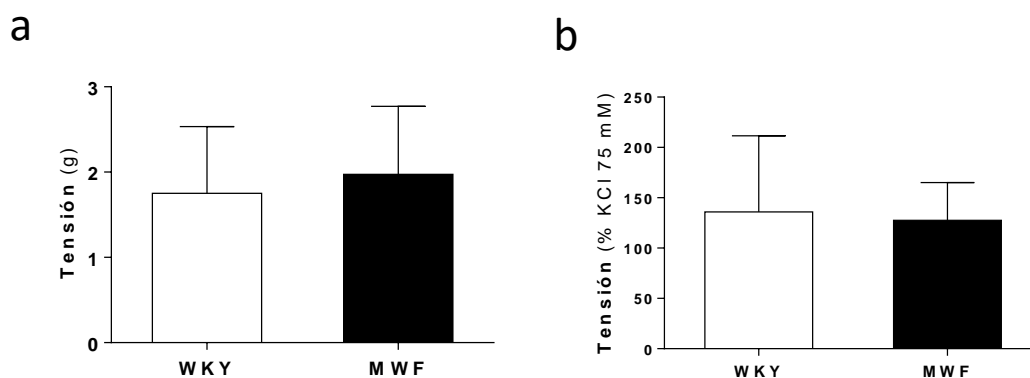


Figura 20. Respuesta contráctil a KCl (75mM; a) y a noradrenalina (NA 10^{-7} M; b) en aorta de animales WKY y MWF. Los resultados se expresan en gramos para KCl y en % de contracción respecto a la respuesta a KCl para NA. Cada resultado representa la media \pm E.S. (n=4-6).

1.2.2 DETERMINACIÓN DE LA RESPUESTA VASODILATADORA DEPENDIENTE E INDEPENDIENTE DE ENDOTELIO

La relajación a acetilcolina (ACh, 10^{-9} - 10^{-4} M) fue significativamente menor en las ratas MWF en comparación con los controles (figura 21a, $p < 0,001$). Mientras que no se observaron diferencias en la respuesta al donador de NO, NPS, entre las distintas cepas (figura 21b).

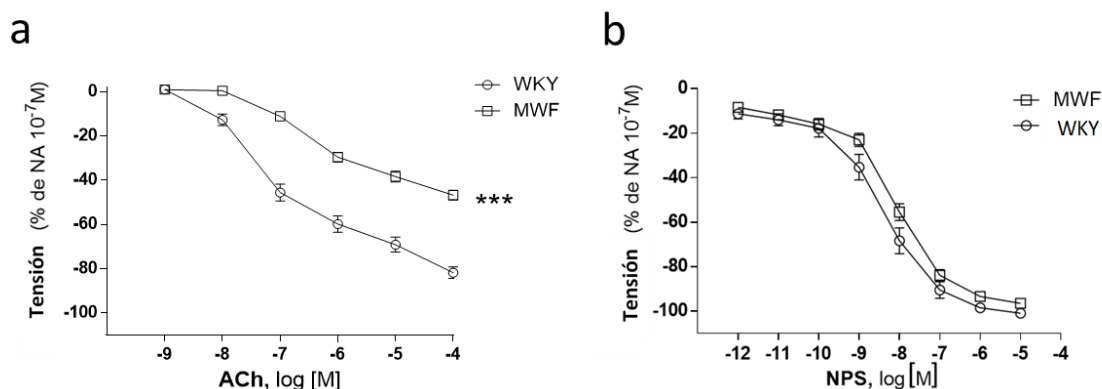


Figura 21. Relajación a ACh (10^{-9} - 10^{-4} M) (a) y a NPS (10^{-12} - 10^{-5} M) (b) en los animales MWF y WKY. Los resultados se expresan como disminución de la tensión en porcentaje de la contracción previa a NA (10^{-7} M). Cada resultado representa la media \pm E.S. (n=4-6); *** $p < 0,001$ respecto al control.

1.2.3 DETERMINACIÓN DE LA CONTRIBUCIÓN DE NO A LA RELAJACIÓN DEPENDIENTE DE ENDOTELIO

La incubación con L-NAME (10^{-4} M) bloqueó totalmente la relajación a ACh tanto en las ratas MWF (figura 22b; $p < 0,001$) como en las controles (figura 22a; $p < 0,001$).

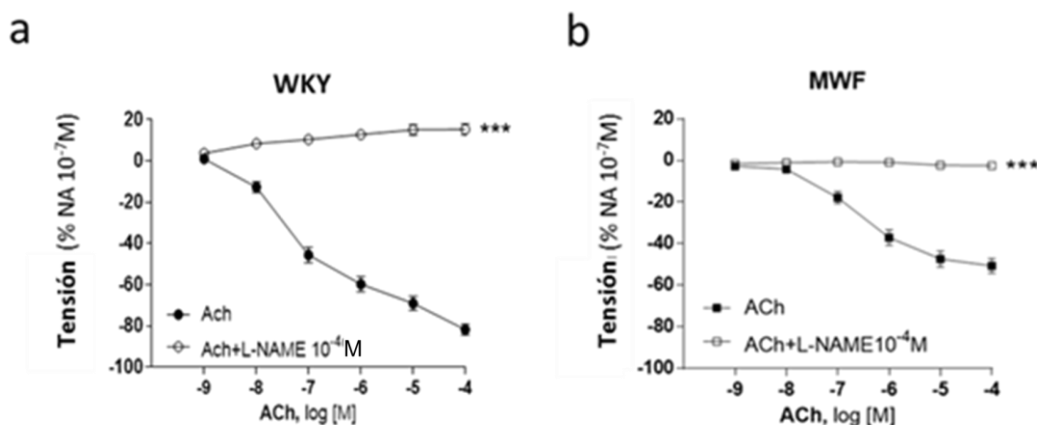


Figura 22. Relajación a ACh (10⁻⁴-10⁻⁹M) en presencia y en ausencia de L-NAME (10⁻⁴M) en animales WKY (a) y MWF (b). Los resultados se expresan como porcentaje de la contracción previa a NA (10⁻⁷ M). Cada resultado representa la media \pm E.S. (n=4-6); *** p<0,001 respecto a su curva control correspondiente a ACh.

Así mismo, no se observaron diferencias significativas en la respuesta máxima alcanzada por las distintas cepas de animales en presencia de L-NAME (tabla 9). Sin embargo, como se observa en la tabla 9, la diferencia entre las ABC en respuesta a ACh en presencia o ausencia de L-NAME (Δ ABC), que de forma indirecta refleja la biodisponibilidad de NO, fue significativamente menor en el grupo MWF en comparación con las ratas WKY (tabla 9; p<0,05). Lo cual sugiere, que en las ratas MWF existe una disminución en la biodisponibilidad de NO.

Tabla 9. Valores de EMax y Δ ABC de la relajación inducida por ACh en presencia (EMax_{L-NAME}) y ausencia (EMax_{ACh}) de L-NAME (10⁻⁴M). Cada resultado representa la media \pm E.S. (n=4-6). *p<0,05 respecto al grupo Wistar.

	WKY	MWF
EMax _{ACh} (%)	-79,25 \pm 2,427	-50,66 \pm 3,541***
EMax _{L-NAME} (%)	-4,673 \pm 3,131	-2,412 \pm 1,792
Δ ABC	220,1 \pm 26,57	110,3 \pm 18,86*

1.2.4 DETERMINACIÓN DE LA CONTRIBUCIÓN DE LOS PROSTANOIDEOS A LA RELAJACIÓN DEPENDIENTE DE ENDOTELIO

La incubación con indometacina (3x10⁻⁶ M) no modificó la relajación a ACh en las ratas WKY (figura 23a; EMax_{ACh}= -79,25 \pm 2,427%; EMax_{INDO}= -79,1 \pm 3,23%), mientras que aumentó significativamente la relajación en las ratas MWF (figura 23b; p<001; EMax_{ACh} = -50,66 \pm 3,541%;

$EMax_{INDO} = -66,1 \pm 4,33\%$). Este resultado sugiere que en las ratas MWF la relajación dependiente de endotelio está modificada por la acción de los prostanoideos vasoconstrictores.

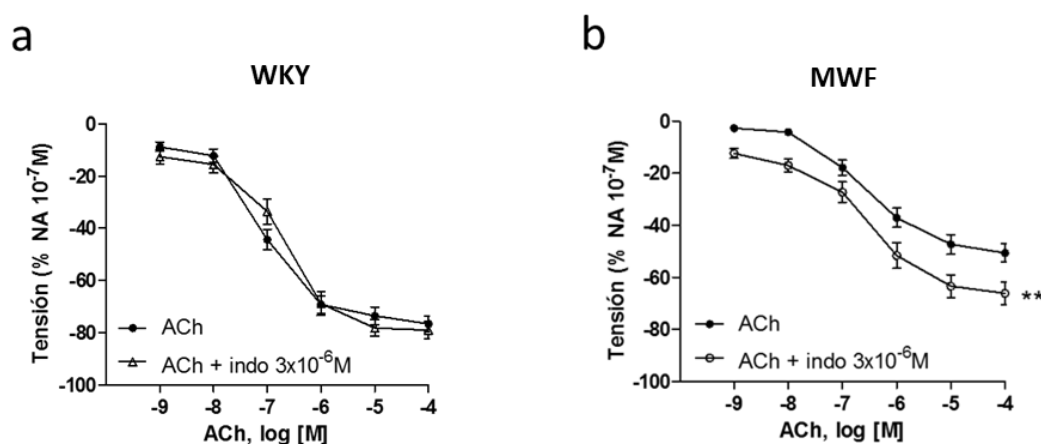


Figura 23. Relajación a ACh (10^{-4} - 10^{-9} M) en presencia y en ausencia de indometacina (3×10^{-6} M) en animales WKY (a) y MWF (b). Los resultados se expresan como porcentaje de la contracción previa a NA (10^{-7} M). Cada resultado representa la media \pm E.S. ($n=4-6$); ** $p<0,01$ respecto a su curva control a ACh.

1.3 ESTUDIO DE MARCADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO Y DEFENSA ANTIOXIDANTE

1.3.1 DETERMINACIÓN DE LA PRESENCIA DE $O_2^{\cdot-}$ EN AORTA TORÁCICA

Dado que el $O_2^{\cdot-}$ es capaz de reaccionar con el NO y formar compuestos como el ONOO $^-$, disminuyendo así la biodisponibilidad de NO, se estudió la presencia de $O_2^{\cdot-}$ en las arterias de las ratas MWF. Estos estudios se realizaron mediante la determinación por microscopía confocal de la fluorescencia roja producida por el DHE como consecuencia de la presencia de $O_2^{\cdot-}$ en los anillos de aorta.

Como se observa en la figura 24, ni en ausencia de DHE (control negativo), ni en los anillos de aorta correspondientes a las ratas WKY apareció fluorescencia roja. Sin embargo, sí se observó esta fluorescencia en los anillos correspondientes a las ratas albuminúricas. Para determinar que la fluorescencia roja se debe al $O_2^{\cdot-}$, que como se explicó en el punto 5.2.1 de la sección material y métodos se localiza en el núcleo de las células, se utilizó la tinción con DAPI, y se observó la colocalización de la fluorescencia roja con la azul correspondiente al núcleo celular en las ratas MWF.

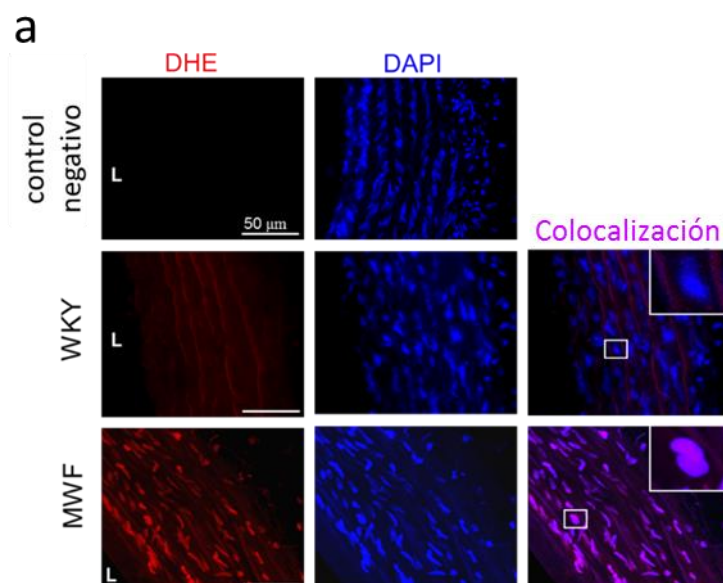


Figura 24. Imagen representativa de la fluorescencia del $O_2^{\cdot -}$ (primera columna), de los núcleos celulares de anillos de aorta de animales WKY y MWF teñidos con DAPI (segunda columna) y de la superposición de ambos (tercera columna) donde se observa la colocalización del $O_2^{\cdot -}$ en el núcleo celular. No aparece fluorescencia en el control negativo, donde no se añadió DHE. El lumen del anillo de aorta se señala como L. (n=6).

1.3.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE NADPH OXIDASA Y SOD EN RIÑÓN

A fin de estudiar si el aumento de estrés oxidativo en la aorta de las ratas albuminúricas, como muestra el resultado anterior, se observa también en el riñón, que es el principal órgano afectado por la albuminuria, se estudió en este tejido la actividad de NADPH oxidasa, como principal enzima productora de EROs y la actividad total de la SOD como enzima encargada de la defensa antioxidante.

Se observó un aumento significativo en la actividad de la enzima NADPH oxidasa en el homogenizado de riñón de los animales MWF, aproximadamente 3 veces superior a la actividad que presentaron los controles WKY (figura 25a; $p < 0,001$). Este aumento en la actividad de la enzima NADPH oxidasa se vio acompañado de una disminución también significativa de la actividad total de SOD en MWF (Figura 25b; $p < 0,05$).

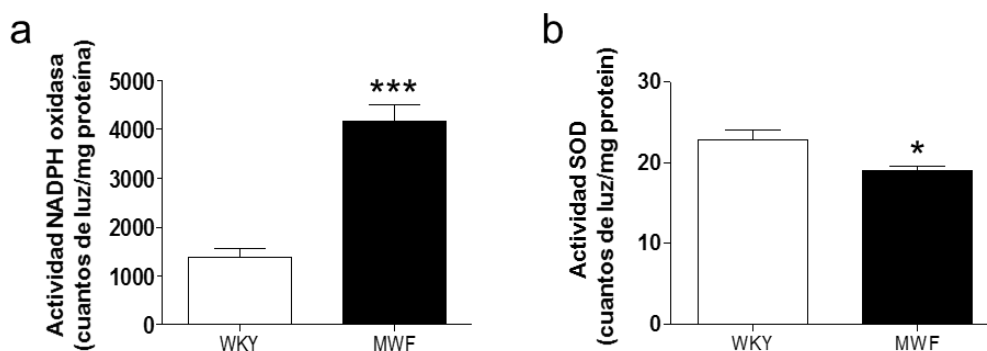


Figura 25. (a) Actividad de NADPH oxidasa y de (b) SOD en homogenizado de riñón de ratas WKY y MWF, expresadas ambas actividades como cuantos de luz por mg de proteína. Cada resultado se expresa como media \pm E.S. (n=4). (*p<0,05; ***p<0,001 respecto al grupo control WKY)

Los resultados anteriores sugieren que la disfunción endotelial observada en las ratas MWF se debe a una disminución en la biodisponibilidad de NO, acompañada por un aumento de $O_2^{\cdot-}$. Este aumento en la producción de $O_2^{\cdot-}$ en los animales albuminúricos, se debe a su vez, a un aumento en la actividad de la NADPH oxidasa y una disminución de la actividad de la SOD.

1.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD GELATINASA DE LAS METALOPROTEASAS DE MATRIZ

La albuminuria es un reflejo del daño en la BFG en el riñón. Una de las causas por las cuales puede producirse el aumento en la filtración de albúmina en el glomérulo, es la pérdida de la estructura de la matriz extracelular que forma parte de dicha barrera de filtración. Las principales enzimas implicadas en el mantenimiento de la estructura de la matriz extracelular son las MMPs, concretamente la MMP2 y la MMP9.

1.4.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD GELATINASA DE MMP2

El estudio de la actividad gelatinasa de la MMP2 por zimografía sólo mostró una banda correspondiente a la actividad de pro-MMP2 (72KDa) tanto en plasma como en riñón (panel superior figura 26a y b, respectivamente). Mediante el análisis densitométrico de la misma se observó un aumento significativo de la actividad de pro-MMP2 en las ratas MWF en

comparación con los controles, tanto en plasma (panel inferior de la figura 26a; $p<0,05$) como en riñón (panel inferior de la figura 26b; $p<0,001$).

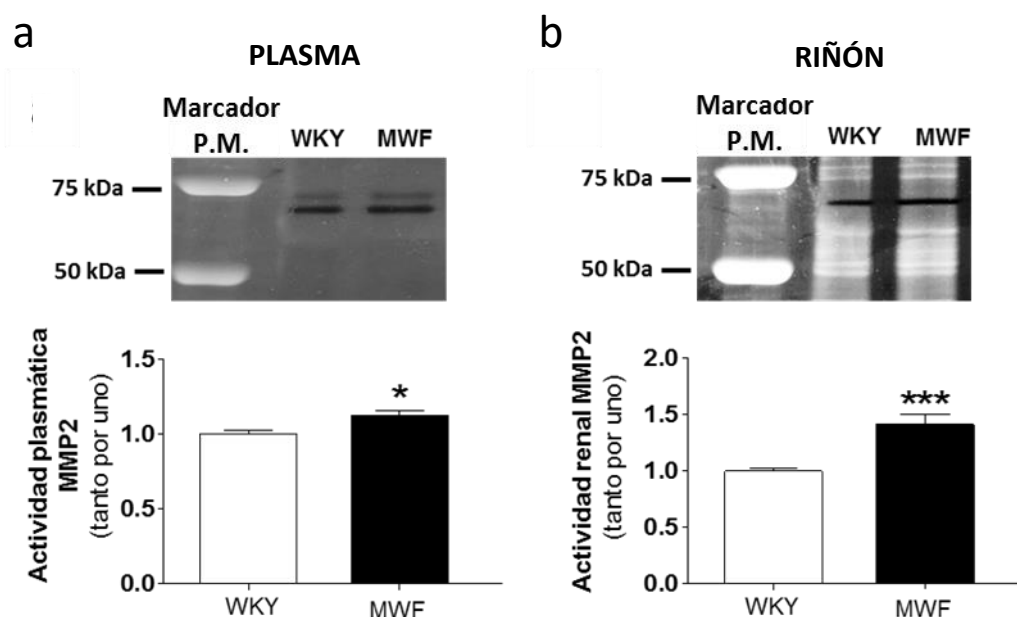


Figura 26. Estudio de la actividad gelatinasa de MMP2 en plasma (a) y en riñón (b). Los paneles superiores muestran un gel de zimografía representativa, y los paneles inferiores la cuantificación densitométrica expresada en tanto por uno frente al grupo control WKY. Los datos se expresan como la media \pm E.S. ($n=4-6$); * $p<0,05$; *** $p<0,001$ respecto al control WKY. Marcador P.M. corresponde a Marcador de Peso Molecular.

1.4.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD GELATINASA DE MMP9

El estudio mediante zimografía en gel de poliacrilamida de la actividad gelatinasa de MMP9 en plasma mostró una banda correspondiente a la forma pro-MMP9 (92KDa) y otra por debajo correspondiente a la forma activa (82KDa) de la enzima (panel superior de la figura 27). Mediante el análisis densitométrico de las mismas se observó un aumento significativo de la actividad tanto de la pro-MMP9 (panel inferior de la figura 27; $p<0,05$) como de la forma activa (panel inferior de la figura 27; $p<0,01$) en el plasma del grupo de animales albuminúricos en comparación con los controles.

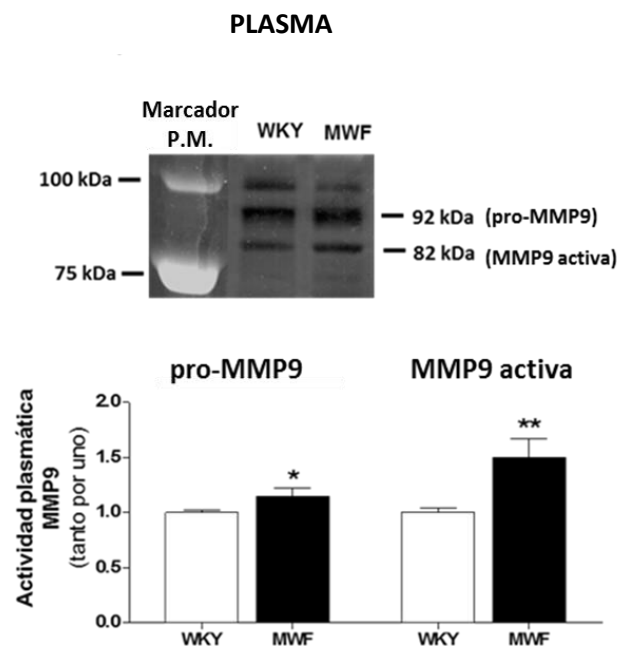


Figura 27. Estudio de la actividad gelatinasa de la MMP9 en plasma. El panel superior muestra un gel de zimografía representativo de la actividad de pro-MMP9 (92 KDa) y de la forma activa (82KDa). El panel inferior muestra el análisis densitométrico de ambas actividades expresado en tanto por uno frente al grupo control WKY. Los datos se expresan como la media \pm E.S. (n=4-6). (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; frente al control WKY). Marcador P.M. corresponde a Marcador de Peso Molecular.

Por lo tanto, al realizar el estudio de la actividad gelatinasa de MMP9 en el homogenizado de riñón se observaron tres bandas en el gel. Una banda superior, que corresponde a la forma inactiva pro-MMP9 que tiene un peso molecular de 92 KDa, una banda intermedia, correspondiente a la forma glicosilada de la enzima (85 KDa) y una banda inferior, que corresponde a la forma activa de la MMP9, con un peso molecular de 82 KDa (panel superior de la figura 28).

Se observó una disminución de la actividad de la pro-MMP9 (92 KDa) en las ratas MWF en comparación con las WKY (panel inferior de la figura 28; $p<0,001$), mientras que tanto la forma glicosilada (85 KDa) como la activa (82 KDa) mostraron un aumento de la actividad en las ratas albuminúricas (panel inferior de la figura 28; $p<0,001$ para la MMP9 glicosilada; $p<0,01$ para la activa).

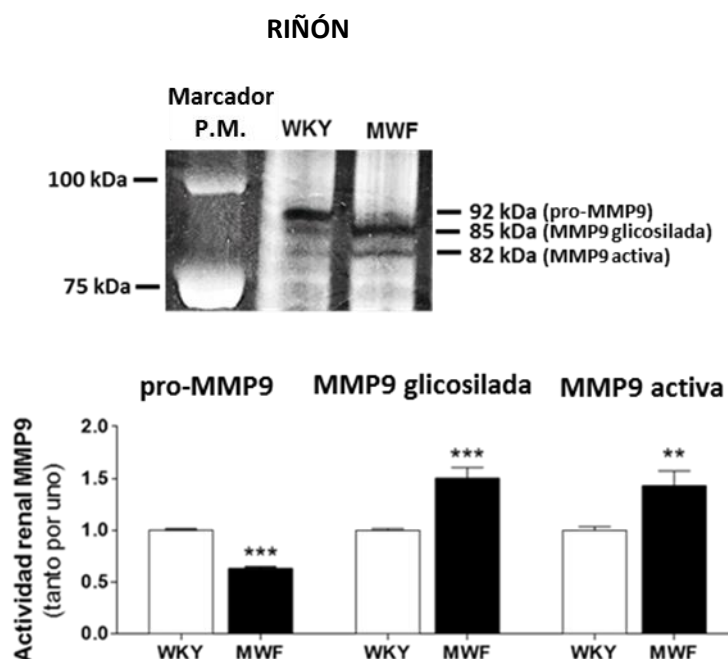


Figura 28. Estudio de la actividad gelatinasa de la MMP9 en riñón. El panel superior muestra un gel de zimografía representativo de las formas pro-MMP9 (92 KDa), glicosilada (MMP9-Gli, 85KDa) y activa (82KDa). El panel inferior muestra el análisis densitométrico de las actividades expresado en tanto por uno frente al grupo control WKY. Los datos se expresan como la media \pm E.S. (n=4-6). **p<0,01; ***p<0,001 frente al control WKY. Marcador P.M. corresponde a Marcador de Peso Molecular.

En las ratas MWF se observa un aumento de la actividad gelatinasa de MMP9 a nivel plasmático y a nivel renal. Estos resultados sugieren la idoneidad de la determinación de la actividad de esta proteasa en plasma como marcador de daño renal en aquellas situaciones en las que no se pueda determinar directamente la actividad renal de MMP9.

2 RELACIÓN ENTRE LA PRESENCIA DE ALBUMINURIA, ESTRÉS OXIDATIVO Y REMODELADO DE LA MATRIZ EXTRACELULAR

Con el objetivo de determinar si los resultados de aumento de estrés oxidativo y de actividad de MMP2 y MMP9 obtenidos en las ratas MWF, se deben exclusivamente a la presencia de albuminuria, se utilizaron, para el siguiente estudio ratas consómicas MWF-8^{SHR} en las que la sustitución del cromosoma 8 en las ratas MWF por el mismo cromosoma de las ratas SHR, produce la eliminación de la albuminuria en esta nueva cepa. Los resultados de los

estudios realizados en las ratas consómicas se compararon con los que se obtuvieron en las ratas MWF y SHR.

2.1 CARACTERIZACIÓN DE LOS DIFERENTES MODELOS EXPERIMENTALES

Como se observa en la tabla 10, el peso corporal no varió entre los distintos modelos experimentales. Las ratas consómicas MWF-8^{SHR}, mantuvieron el cociente peso del riñón/peso corporal de la cepa parental MWF, siendo significativamente menor para ambas en comparación con las ratas SHR (tabla 10; $p < 0,001$ en comparación tanto con MWF como con MWF-8^{SHR}). Las ratas consómicas mantuvieron los valores de normotensión de las ratas MWF, mientras que en las ratas SHR la PAS fue significativamente superior (tabla 10; $p < 0,001$ tanto en comparación con MWF como con MWF-8^{SHR}) y se acompañó de un mayor cociente del peso del corazón/peso corporal (tabla 10; $p < 0,01$ tanto en comparación con MWF como con MWF-8^{SHR}). Las ratas MWF-8^{SHR} presentaron valores de albúmina en orina significativamente menores que las ratas MWF y similares a los de las ratas SHR (tabla 10; $p < 0,001$ para MWF-8^{SHR} y para SHR en comparación con MWF). Por último, en las ratas consómicas, los niveles plasmáticos de 25-hidroxicolecalciferol fueron significativamente superiores en comparación con MWF (tabla 10, $p < 0,001$), manteniendo valores similares a los de las ratas SHR (tabla 10 y a las ratas WKY (tabla 8).

Tabla 10. Caracterización de los modelos animales, MWF, MWF-8^{SHR} y SHR. Los resultados se expresan como la media \pm E.S. (n=4-6) ^{##} $p < 0,01$; ^{###} $p < 0,001$ con respecto al grupo MWF; ^{\$\$} $p < 0,01$; ^{\$\$\$} $p < 0,001$ con respecto al grupo MWF-8^{SHR}.

Variable	MWF	MWF-8 ^{SHR}	SHR
Peso corporal (g)	302,6 \pm 4,3	313,2 \pm 6,1	287,2 \pm 9,3
Peso riñón/peso corporal (mg/g)	5,25 \pm 0,10	5,07 \pm 0,09	6,25 \pm 0,26 ^{###, \$\$\$}
Peso corazón/peso corporal (mg/g)	2,56 \pm 0,08	2,56 \pm 0,04	2,86 \pm 0,02 ^{##, \$\$}
PAS (mmHg)	146 \pm 1	156 \pm 6	178 \pm 2 ^{###, \$\$\$}
Excreción urinaria de albúmina (mg/24h)	46,2 \pm 4,0	4,8 \pm 0,6 ^{###}	1,1 \pm 0,2 ^{###}
25-hidroxicolecalciferol (ng/mL)	10,58 \pm 1,38	23,55 \pm 0,7 ^{###}	26,31 \pm 1,21 ^{###}

2.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE NADPH OXIDASA Y SOD EN HOMOGENIZADO DE RIÑÓN

Como se observa en la figura 29 los valores de actividad de NADPH oxidasa, determinados en homogenizado de riñón, disminuyeron significativamente en la cepa consómica MWF-8^{SHR} en comparación con MWF (figura 29a; $p < 0,001$) hasta llegar a valores similares a los de las

ratas controles WKY (el 100% señalado por la línea discontinua en la gráfica representa los valores de actividad NADPH oxidasa en homogenizado de riñón de los animales WKY). La actividad de esta enzima, fue incluso, significativamente inferior en los animales consómicos MWF-8^{SHR} en comparación con SHR (figura 29a; $p<0,001$).

Por otro lado, la determinación de la actividad de la enzima SOD (figura 29b) mostró un aumento significativo en los homogenizados de riñón de las ratas consómicas MWF-8^{SHR} en comparación con MWF (figura 29b; $p<0,01$). Además la actividad de esta enzima, fue incluso, significativamente superior en la cepa consómica MWF-8^{SHR} en comparación con SHR (figura 29b; $p<0,05$). Estos resultados sugieren que la eliminación de la albuminuria restaura la actividad de la enzima pro-oxidante NADPH oxidasa y de la enzima antioxidante SOD.

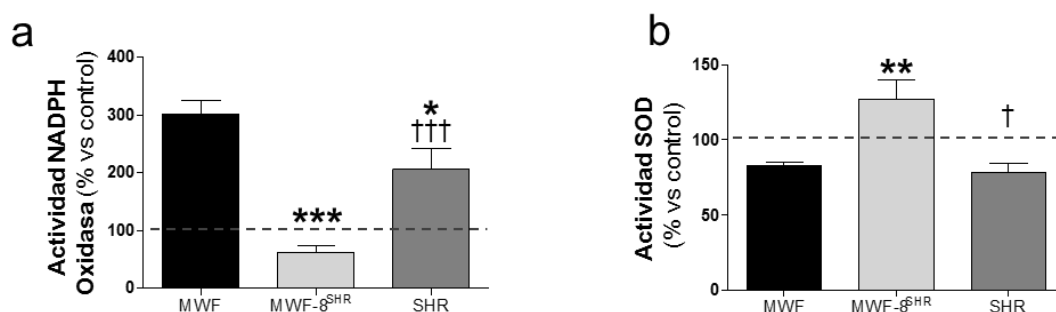


Figura 29. (a) Actividad de NADPH oxidasa y de (b) SOD, en homogenizado de riñón de ratas MWF, MWF-8^{SHR} y SHR expresadas ambas como porcentaje de actividad frente a WKY. Cada resultado se expresa como media \pm E.S. ($n=4$). (* $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ respecto a MWF; † $p<0,05$; ††† $p<0,001$ respecto a MWF-8^{SHR}).

2.3 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD GELATINASA DE MMPs

2.3.1 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD GELATINASA DE MMP2

El estudio mediante zimografía de la actividad de MMP2, tanto en plasma (figura 30a) como en riñón (figura 30b), sólo mostró una banda correspondiente a pro-MMP2 (72 KDa). En el plasma de los animales MWF no se observaron diferencias significativas en comparación con las ratas consómicas, ni con las ratas SHR (figura 30a). Sin embargo, sí se observó una disminución significativa de la actividad de pro-MMP2 en riñón de las ratas consómicas MWF-8^{SHR} y de las ratas SHR frente a los albuminúricos MWF (figura 30b; $p<0,05$) hasta alcanzar niveles similares a los del grupo control WKY.

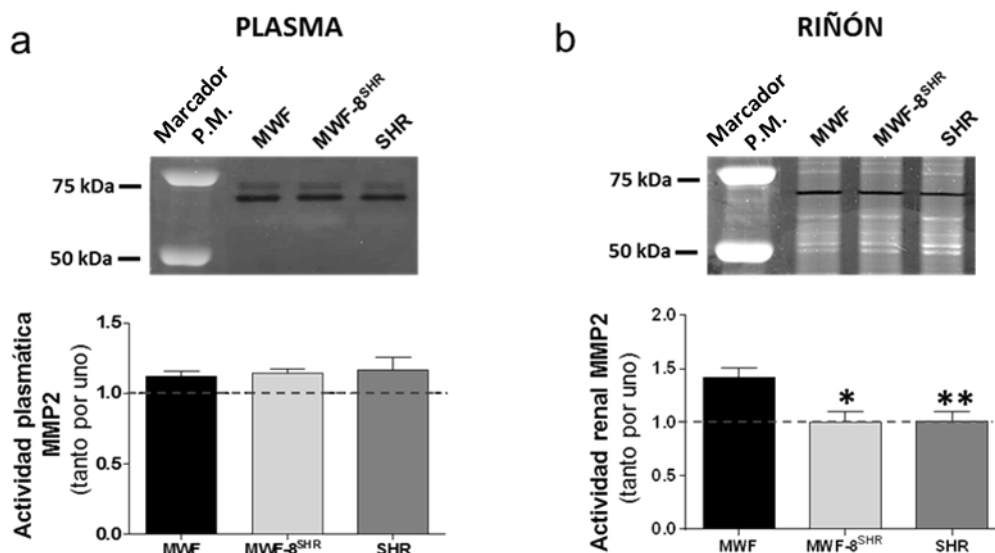


Figura 30. Estudio de la actividad de MMP2 en plasma (a) y en riñón (b) de ratas MWF, MWF-8^{SHR} y SHR. Los paneles superiores muestran una zimografía representativa, y los paneles inferiores la cuantificación densitométrica expresada en tanto por uno respecto al grupo control WKY, que se representa como uno por la línea discontinua de ambas gráficas. Los datos se expresan como la media \pm E.S. (n=4-6). (*p<0,05; **p<0,01 frente al grupo MWF). Marcador P.M. corresponde a Marcador de Peso Molecular.

2.3.2 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD GELATINASA DE MMP9

Como se observa en la siguiente gráfica que muestra los valores de actividad gelatinasa de MMP9, la actividad de esta proteasa disminuyó significativamente tanto en plasma (figura 31a; $p<0,05$) como en homogenizado de riñón (figura 31b; $p<0,05$) en las ratas consómicas MWF-8^{SHR} frente a MWF, hasta alcanzar valores similares a los de las ratas WKY. Los valores de actividad de esta proteasa tanto en plasma como en riñón en las ratas espontáneamente hipertensas SHR, también fueron significativamente inferiores en comparación con las ratas albuminúricas (figura 31 a y b respectivamente; $p<0,05$), presentado valores similares a los de las ratas consómicas y las controles.

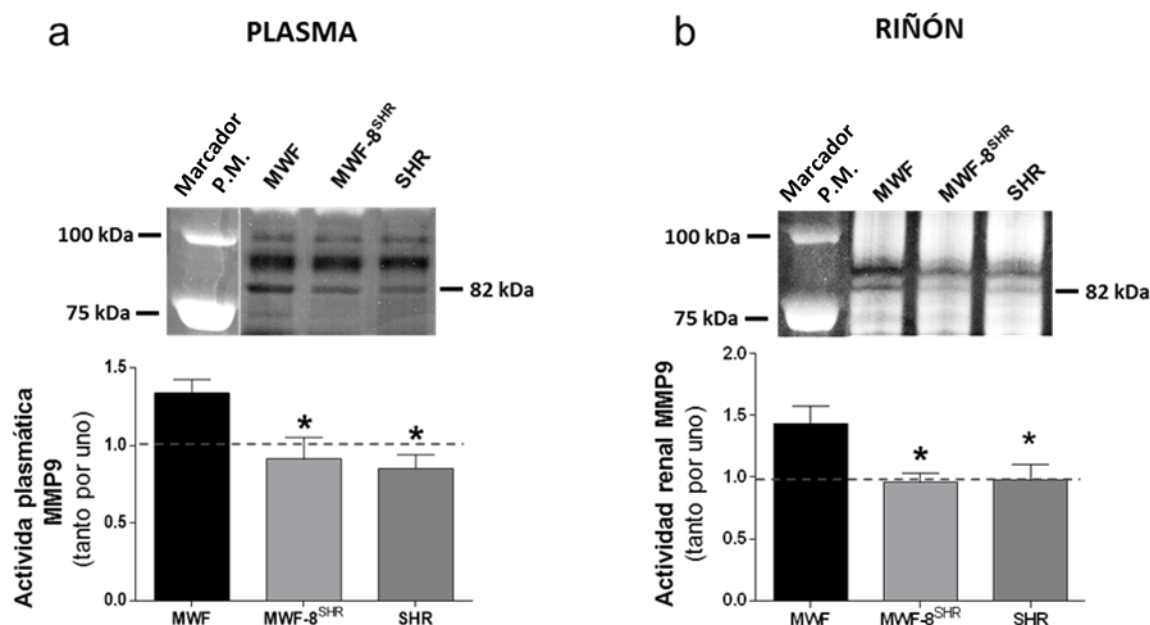


Figura 31. Estudio de la actividad gelatinasa de MMP9 en plasma (a) y en riñón (b) respectivamente de ratas, MWF, MWF-8^{SHR} y SHR. Los paneles de la izquierda muestran una zimografía representativa de MMP9. Los paneles de la derecha muestran el análisis densitométrico de ambas actividades expresado en tanto por uno frente al grupo control WKY que se representa como uno por la línea discontinua en ambas gráficas. Los datos se expresan como la media \pm E.S. (n=4-6). (*p<0,05 frente al grupo MWF). Marcador P.M. corresponde a Marcador de Peso Molecular.

La actividad de las enzimas NADPH y SOD, implicadas en la aparición de estrés oxidativo, así como la actividad gelatinasa tanto de la MMP2 como de la MMP9 se restauran al desaparecer la albuminuria.

3 EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON CALCITRIOL SOBRE EL MODELO DE RATA ESPONTÁNEAMENTE ALBUMINÚRICA MWF

Debido a la disminución de 25-hidroxicoalciferol, observada en plasma en los animales con albuminuria, se planteó el siguiente objetivo de la presente tesis doctoral, determinar si un tratamiento crónico con calcitriol (metabolito activo de la vitamina D), era capaz de revertir la albuminuria y los parámetros alterados como consecuencia de la misma en las ratas MWF.

3.1 CARACTERIZACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL TRAS EL TRATAMIENTO

Como se observa en la tabla 11, el tratamiento con calcitriol no modificó la longitud de la tibia, el cociente peso del corazón/longitud de la tibia, el cociente peso de los riñones/longitud de la tibia ni ninguno de los parámetros hemodinámicos medidos, PAS, PP, FC y VOP en ninguno de los modelos experimentales.

Tabla 11. Características de los animales tras el tratamiento. Cada resultado expresa la media \pm E.S (n=4-6) (*p<0,05 frente al grupo Wistar VEHÍCULO; #p<0,05; ##p<0,01 frente al grupo Wistar CALCITRIOL).

Variable	WISTAR		MWF	
	Vehículo	Calcitriol	Vehículo	Calcitriol
Longitud tibia	5,61 \pm 0,07	5,64 \pm 0,08	5,43 \pm 0,12	5,28 \pm 0,09 [#]
Peso corazón (g)/LT (cm)	0,20 \pm 0,005	0,21 \pm 0,0104	0,20 \pm 0,007	0,21 \pm 0,004
Peso riñón (g)/LT (cm)	0,18 \pm 0,011	0,20 \pm 0,006	0,16 \pm 0,007 [#]	0,15 \pm 0,005 ^{*,##}
PAS (mmHg)	144,8 \pm 18,44	130,6 \pm 10,61	159,4 \pm 13,83	157,4 \pm 11,12
PP (mmHg)	18,14 \pm 8,09	21,56 \pm 2,77	31,87 \pm 4,91	28,70 \pm 3,53
FC (lpm)	294,4 \pm 20,32	270,0 \pm 15,72	258,2 \pm 4,78	257,6 \pm 5,79
VOP (m/s)	5,63 \pm 0,67	5,00 \pm 0,19	5,31 \pm 0,24	5,88 \pm 0,91

3.2 DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS EN PLASMA

Se determinó la concentración de 25-hidroxicolecalciferol en las muestras de plasma de las ratas tanto albuminúricas como controles, tratadas con calcitriol o con vehículo. Como se observa en la tabla los niveles de 25-hidroxicolecalciferol no se modificaron tras el tratamiento. Como la vitamina D actúa sobre el equilibrio de la concentración de calcio y fósforo se analizaron estos metabolitos en el plasma de las ratas, sin embargo, este análisis no mostró diferencias significativas en las ratas WKY y las MWF (tabla 12) tras el tratamiento. Por último, la determinación de creatinina tanto en plasma como en orina tampoco mostró diferencias significativas entre las cepas, ni se vio modificada tras el tratamiento con calcitriol.

Tabla 12. Determinaciones bioquímicas tras el tratamiento. Los datos se expresan como la media \pm E.S. (n=4-6).

***p<0,001 vs ratas controles WKY tratadas con vehículo; ##p<0,01 vs ratas controles WKY tratadas con calcitriol.

	WISTAR		MWF	
	Vehículo	Calcitriol	Vehículo	Calcitriol
25-hidroxicolecalciferol (ng/mL)	30,49 \pm 3,54	29,50 \pm 1,40	18,03 \pm 1,45 ^{***,##}	18,93 \pm 1,60 ^{***,##}
Calcio (mg/mL)	9,23 \pm 0,37	9,57 \pm 0,16	9,13 \pm 0,17	8,82 \pm 0,29
Fósforo (mg/mL)	8,10 \pm 0,60	9,017 \pm 0,65	7,983 \pm 0,31	7,833 \pm 0,33
Creatinina sérica (mg/mL)	0,46 \pm 0,04	0,52 \pm 0,02	0,4417 \pm 0,05	0,5067 \pm 0,04
Creatinina orina (mg/mL)	116,5 \pm 45,68	81,12 \pm 20,93	156,2 \pm 10,22	161,7 \pm 21,48

3.3 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON CALCITRIOL SOBRE LA FUNCIÓN VASCULAR EN AORTA

3.3.1 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON CALCITRIOL SOBRE LA RESPUESTA CONTRÁCTIL

La respuesta contráctil a KCl (75 mM) fue significativamente superior (figura 32; $p < 0,001$) en los animales albuminúricos en comparación con los controles y no se vio modificada tras el tratamiento con calcitriol.

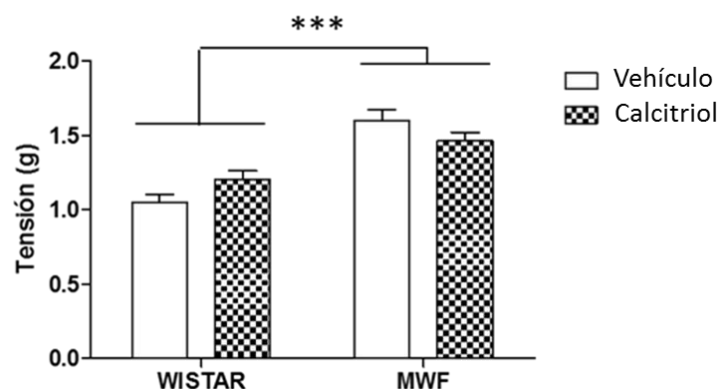


Figura 32. Respuesta contráctil a KCl (75 mM) en aorta en animales Wistar y MWF tanto tratados con vehículo, como con calcitriol. Los resultados se expresan en gramos (g). Cada resultado representa la media \pm E.S. (n=4-6). *** $p < 0,001$ respecto al grupo Wistar.

No se observaron diferencias significativas en la contracción a NA (10^{-7} M) entre los grupos experimentales (figura 33). Además, esta respuesta contráctil no se modificó tras el tratamiento con calcitriol.

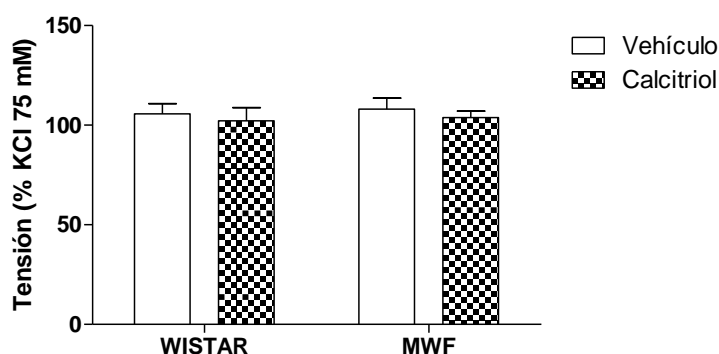


Figura 33. Respuesta contráctil a NA (10^{-7} M) en aorta en animales Wistar y MWF tanto tratados con vehículo, como con calcitriol. Los resultados se expresan como porcentaje de contracción respecto a la contracción a KCl. Cada resultado representa la media \pm E.S. (n=4-6).

3.3.2 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON CALCITRIOL SOBRE LA RESPUESTA VASODILATADORA DEPENDIENTE DE ENDOTELIO

Como se observa en la gráfica (figura 34), en las ratas MWF, el tratamiento con calcitriol aumentó de forma significativa la respuesta vasodilatadora en comparación con el grupo de animales tratado con vehículo ($EMax_{MWF\text{ Vehículo}} = -50,66 \pm 3,541\%$; $EMax_{MWF\text{ Calcitriol}} = -63,76 \pm 3,454\%$; figura 34; $p < 0,01$). Sin embargo, no modificó la respuesta a ACh en los animales controles Wistar ($EMax_{Wistar\text{ Vehículo}} = -79,25 \pm 2,427\%$; $EMax_{Wistar\text{ Calcitriol}} = -81,38 \pm 2,735\%$) (figura 34).

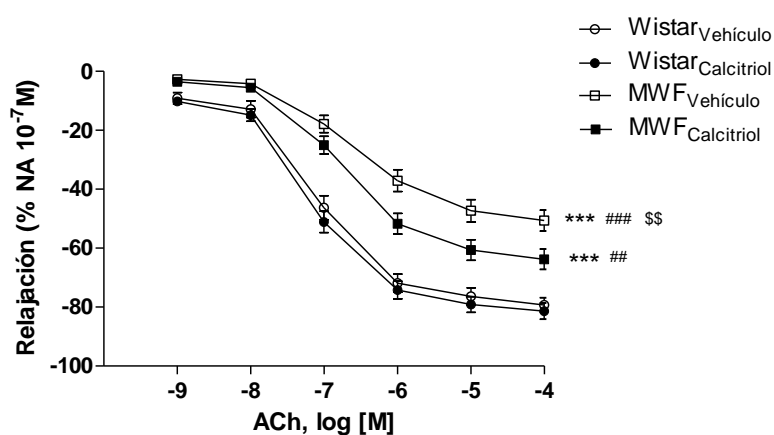


Figura 34. Relajación a ACh (10^{-9} - 10^{-4} M) en los grupos de animales Wistar y MWF tratados con vehículo o con calcitriol. Los resultados se expresan como disminución de la tensión en porcentaje de la contracción previa a NA (10^{-7} M). Cada resultado representa la media \pm E.S. ($n=4-6$). *** $p < 0,001$ respecto al grupo Wistar_{VEHÍCULO}; ## $p < 0,01$; ### $p < 0,001$ respecto al grupo Wistar_{CALCITRIOL}; \$\$ $p < 0,01$ respecto al grupo MWF_{VEHÍCULO}

3.3.3 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON CALCITRIOL SOBRE LA RESPUESTA VASODILATADORA INDEPENDIENTE DE ENDOTELIO

Como se observa en la gráfica no se observaron diferencias significativas en la respuesta vasodilatadora a NPS (10^{-12} - 10^{-5} M) tras el tratamiento con calcitriol ni en los animales albuminúricos ni en los controles (figura 35).

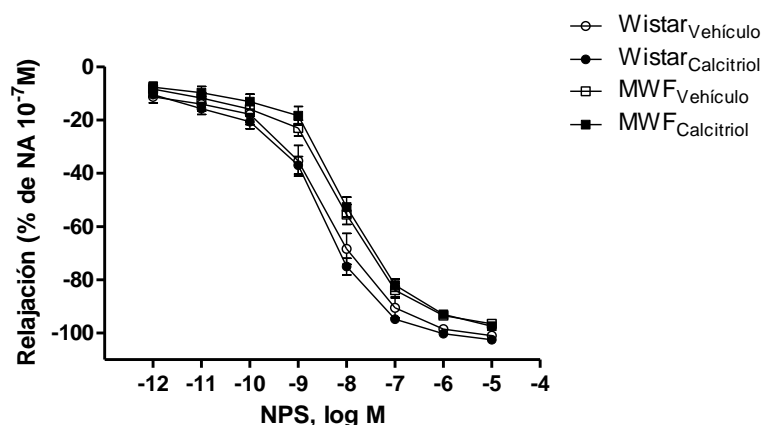
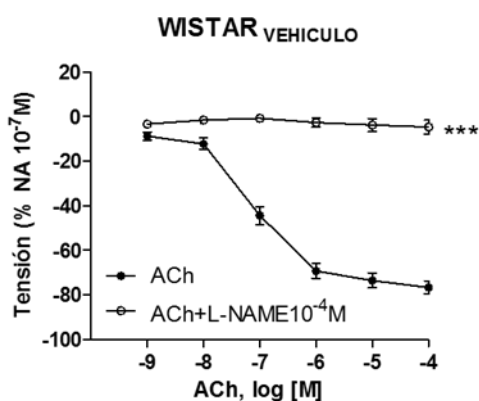


Figura 35. Relajación a NPS (10^{-12} - 10^{-5} M) en los grupos de animales Wistar y MWF tanto tratados con vehículo, como con calcitriol. Los resultados se expresan como disminución de la tensión en porcentaje de la contracción previa a NA (10^{-7} M). Cada resultado representa la media \pm E.S. (n=4-6)

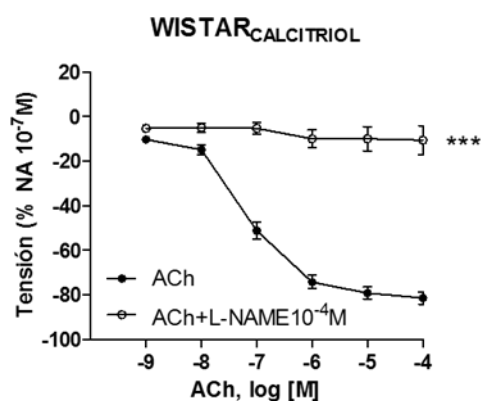
3.3.4 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON CALCITRIOL SOBRE LA CONTRIBUCIÓN DEL NO A LA RELAJACIÓN DEPENDIENTE DE ENDOTELIO

Como se observa en la figura 36, tanto en animales Wistar tratados con vehículo (panel a) o con calcitriol (panel b), como en animales MWF tratados con vehículo (panel c) o con calcitriol (panel d), se determinó la contribución del NO a la respuesta vasodilatadora tras el tratamiento con calcitriol. Para ello se incubaron los anillos de aorta con el inhibidor de la NOS, L-NAME. La respuesta a ACh, que se redujo significativamente en todos los grupos experimentales en presencia de L-NAME (10^{-4} M) (figura 36; $p < 0,001$), no se modificó tras el tratamiento con calcitriol.

a



b



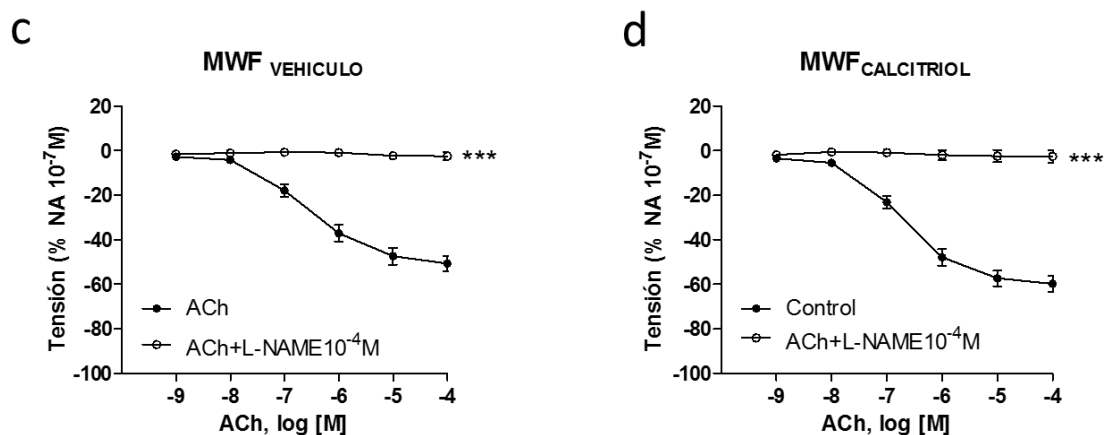


Figura 36. Relajación a ACh (10^{-9} - 10^{-4} M) en presencia de L-NAME (10^{-4} M) en aorta de los animales Wistar_{VEHÍCULO}, Wistar_{CALCITRIOL}, MWF_{VEHÍCULO} y MWF_{CALCITRIOL}. Los resultados se expresan como disminución de la tensión en porcentaje de la contracción previa a NA (10^{-7} M). Cada resultado representa la media \pm E.S. (n=4-6). ***p<0,001 respecto a su curva a ACh correspondiente.

Se analizó, la diferencia entre las ABC en respuesta a ACh en presencia o ausencia de L-NAME (Δ ABC), que de forma indirecta refleja la biodisponibilidad de NO. Como se observa en la tabla 13, el grupo de animales control, no mostró diferencias significativas tras el tratamiento. Así mismo, en el grupo de ratas MWF tratadas con calcitriol no se observaron diferencias significativas en el Δ ABC en comparación con los animales control, a pesar de que estas diferencias se mantuvieron en el grupo de animales MWF tratados con vehículo (tabla 13; *p<0,05; ##p<0,01). Estos resultados indican, que en las ratas MWF el tratamiento con calcitriol produjo un aumento en la biodisponibilidad de NO.

Tabla 13. Valores de EMax y Δ ABC de la relajación inducida por ACh en presencia de L-NAME (10^{-4} M). Cada resultado representa la media \pm E.S. (n=4-6). *p<0,05 respecto al grupo Wistar_{VEHÍCULO}; ##p<0,01 respecto al grupo Wistar_{CALCITRIOL} (n=4-6).

	Wistar _{VEHÍCULO}	Wistar _{CALCITRIOL}	MWF _{VEHÍCULO}	MWF _{CALCITRIOL}
EMax _{ACh}	-79,25 \pm 2,427	-81,38 \pm 2,735	-50,66 \pm 3,541	-63,76 \pm 3,454
EMax _{L-NAME} (%)	-4,673 \pm 3,131	-10,59 \pm 6,489	-2,412 \pm 1,792	-2,584 \pm 2,854
Δ ABC	220,1 \pm 26,57	209,5 \pm 12,36	110,3 \pm 18,86*, ##	147,6 \pm 25,63

3.3.5 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON CALCITRIOL SOBRE LA CONTRIBUCIÓN DE LOS PROSTANOIDES A LA RELAJACIÓN DEPENDIENTE DE ENDOTELIO

El tratamiento con calcitriol no modificó la respuesta a ACh en presencia de indometacina en el grupo control tras el tratamiento (figura 37 a y b; indo, $3 \times 10^{-6} \text{M}$). Sin embargo, en los animales albuminúricos, el tratamiento con calcitriol revierte la modificación de la respuesta a ACh por prostanoïdes vasoconstrictores (figura 37d), ya que no se observa un aumento de la relajación tras la incubación con indometacina que sí se observa en los animales MWF tratados con vehículo (figura 37c; $p < 0,01$).

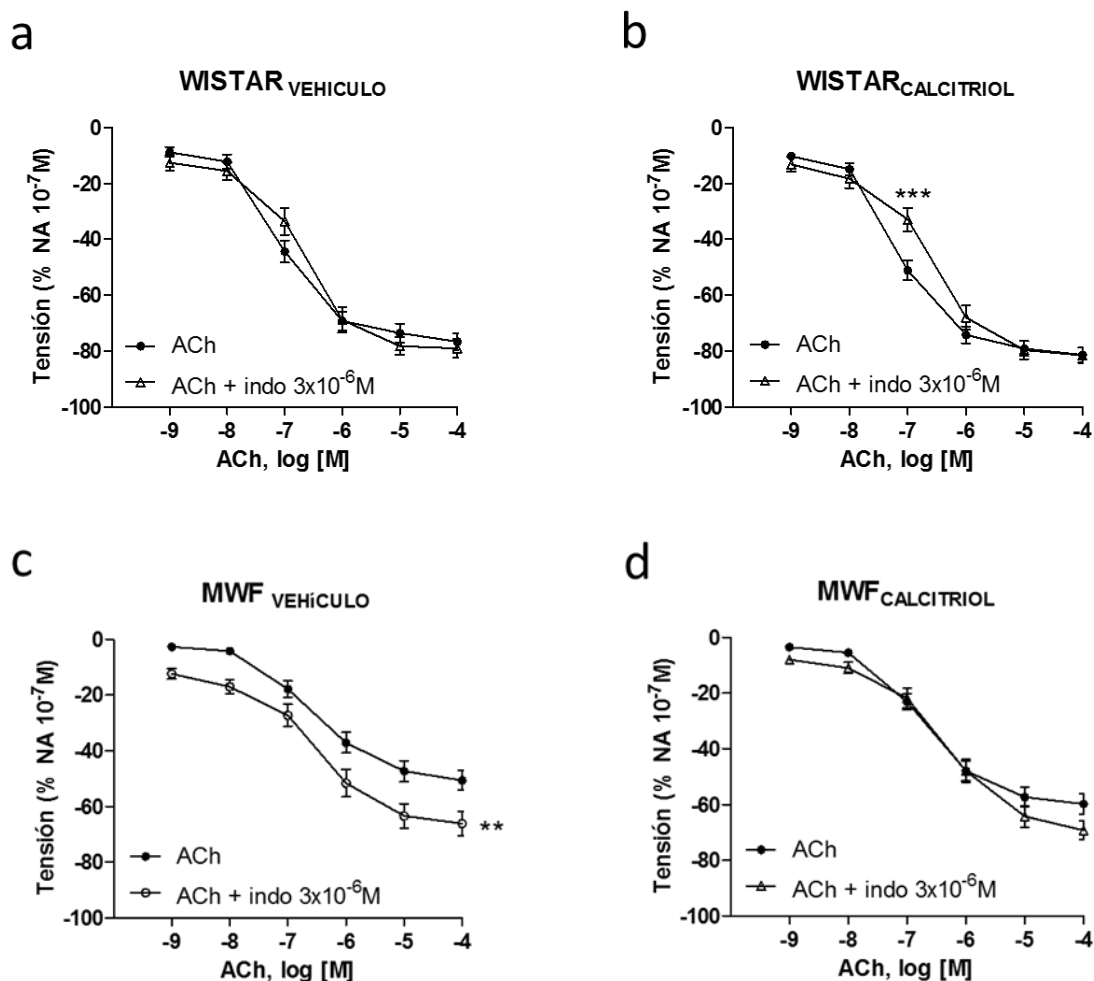


Figura 37. Relajación a ACh (10^{-9} - 10^{-4}M) en presencia de indometacina ($3 \times 10^{-6} \text{M}$) en aorta de los animales Wistar_{VEHICULO}, Wistar_{CALCITRIOL}, MWF_{VEHICULO} y MWF_{CALCITRIOL}. Los resultados se expresan como disminución de la tensión en porcentaje de la contracción previa a NA (10^{-7}M). Cada resultado representa la media \pm E.S. (n=4-6). ** $p < 0,01$ respecto a su curva a ACh correspondiente.

Para corroborar los resultados anteriores se determinaron los valores de la respuesta máxima obtenida en la relajación a ACh tras el tratamiento con calcitriol. Como se observa en la tabla 14, la EMax de la respuesta vasodilatadora en las ratas MWF tratadas con calcitriol no se modifica tras la incubación con indometacina ($3 \times 10^{-6} \text{M}$), mientras que este efecto no se observa en el grupo de animales albuminúricos que están tratados con vehículo.

Tabla 14. Valores de EMax y ABC de la relajación inducida por ACh en presencia o ausencia de indometacina (indo $3 \times 10^{-6} \text{M}$) en anillos de aorta de los animales Wistar y MWF tratados tanto con vehículo como con calcitriol. Cada resultado representa la media \pm E.S. (n=4-6). **p<0,01 respecto su curva a ACh en ausencia de indometacina correspondiente.

		WISTAR VEHÍCULO	WISTAR CALCITRIOL	MWF VEHÍCULO	MWF _{CALCITRIOL}
EMax (%)	ACh	-79,3 \pm 2,42	-81,38 \pm 2,735	-50,7 \pm 3,54	-63,76 \pm 3,454
	ACh + indo 10^{-6}M	-79,1 \pm 3,23	-81,5 \pm 2,81	-66,1 \pm 4,33**	-69,22 \pm 3,292

El tratamiento con calcitriol produce un aumento de la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio, que se acompaña por un aumento de la biodisponibilidad de NO y la eliminación del efecto de los prostanoïdes vasoconstrictores en las ratas albuminúricas.

3.4 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON CALCITRIOL SOBRE LA ACTIVIDAD GELATINASA DE MMP9

La determinación de la actividad gelatinasa de MMP2 y MMP9 mediante zimografía en geles de poliacrilamida realizados anteriormente sólo mostró bandas correspondientes a la forma activa de las MMPs en el caso de MMP9 (figura 27 y 28), mostrando en el caso de la MMP2 una única banda correspondiente al zimógeno (figura 26). Por esta razón, sólo se estudió si el tratamiento con calcitriol modificaba la actividad gelatinasa de MMP9.

Como se observa en la figura 38, mientras que en el grupo control no se produjeron modificaciones en la actividad gelatinasa de MMP9 ni en plasma (figura 38a) ni en tejido renal (figura 38b), el tratamiento con calcitriol en el grupo de animales albuminúricos produjo una disminución significativa de la actividad de esta metaloproteasa tanto a nivel plasmático (figura 38a; $p<0,05$), como renal (figura 38b; $p<0,05$).

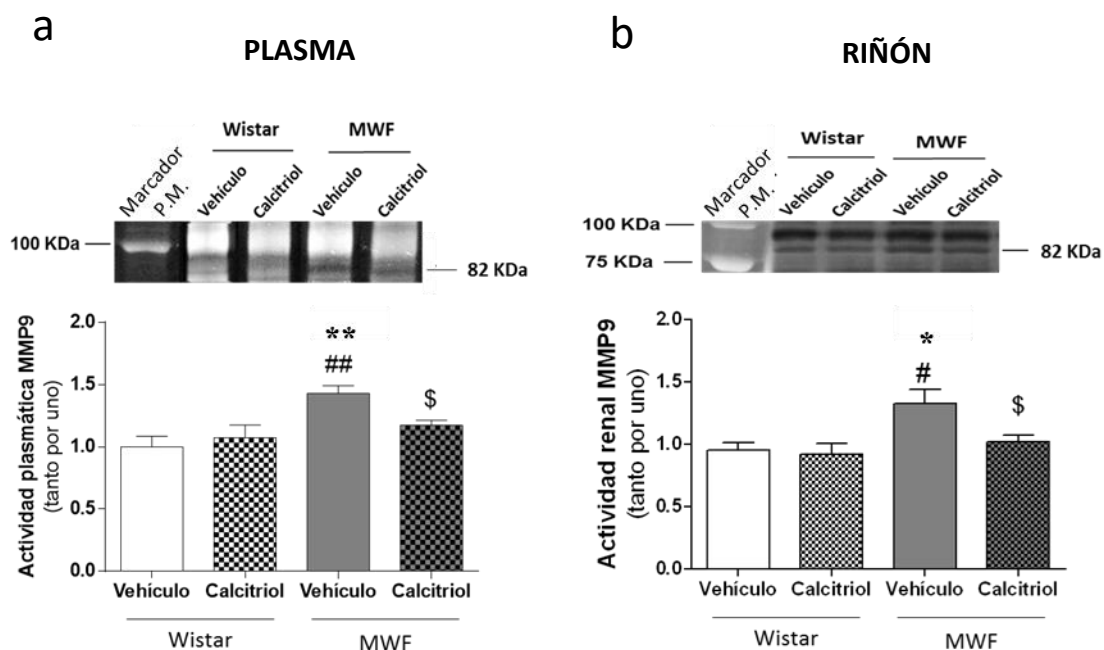


Figura 38. Estudio de la actividad gelatinasa de MMP9 en plasma (a) y en riñón (b) en animales Wistar y MWF tanto tratados con vehículo, como con calcitriol. Los paneles superiores muestran una zimografía representativa, y los paneles inferiores la cuantificación densitométrica expresada en tanto por uno frente al grupo control Wistar_{VEHÍCULO}. Los datos se expresan como la media \pm E.S. ($n=4-6$). * $p<0,05$; ** $p<0,01$ respecto al grupo Wistar_{VEHÍCULO}; # $p<0,05$; ## $p<0,01$ respecto al grupo Wistar_{CALCITRIOL}; \$ $p<0,05$ respecto al grupo MWF_{VEHÍCULO}. Marcador P.M. corresponde a Marcador de Peso Molecular.

El tratamiento con calcitriol disminuye la actividad gelatinasa de MMP9 tanto en el plasma, como en el riñón de las ratas MWF.

4 MARCADORES DE REMODELADO Y DE ESTRÉS OXIDATIVO IMPLICADOS EN LA ALBUMINURIA DESARROLLADA BAJO BLOQUEO CRÓNICO DE SRA

4.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES

En la tabla 15 se muestran los datos demográficos de los pacientes hipertensos incluidos en el estudio al finalizar los 2 años de seguimiento. Los grupos en los que se dividió a los pacientes fueron homogéneos, ya que no se observaron diferencias en la edad, ni el IMC, sin embargo, el porcentaje de hombres en el grupo de pacientes con albuminuria resistente severa fue significativamente superior al de hombres en los otros dos grupos (tabla 15). El bloqueo del SRA en los pacientes normoalbuminúricos y pacientes con albuminuria resistente moderada consiguió establecer el control de la presión arterial como muestran los valores de presión arterial sistólica y diastólica determinada durante 24 horas (PAS-24h, PAD-24 h). En el caso de los pacientes con albuminuria resistente severa, se consiguió el buen control de la presión arterial en todos los pacientes salvo dos que presentaron valores de PAS-24h en el rango de hipertensión grado 1 (140-159 mmHg). A pesar del control de la presión arterial, un grupo de pacientes desarrolló albuminuria pese a encontrarse en tratamiento crónico antihipertensivo con bloqueantes del SRA. A esta albuminuria desarrollada bajo el bloqueo crónico del SRA se la denominó albuminuria resistente o escape de albuminuria. Se dividió a los pacientes con albuminuria resistente en dos grupos en función del grado de albuminuria, aquellos que presentaron albuminuria moderada y aquellos que presentaron albuminuria resistente.

Los pacientes con albuminuria resistente tanto moderada, como severa mostraron un aumento significativo de la excreción urinaria de albúmina en comparación con los normoalbuminúricos (tabla 15; $p<0,001$ para ambos grupos). Ésta fue, además, significativamente superior en el grupo de pacientes con albuminuria resistente severa en comparación con los que presentaron albuminuria resistente moderada (tabla 15; $p<0,001$). En este sentido, los pacientes con albuminuria resistente severa mencionados anteriormente que se encontraban en grado 1 de hipertensión no fueron los que mostraron los mayores valores de excreción urinaria de albúmina.

Los pacientes con albuminuria severa presentaron una disminución significativa del IFGe en comparación con los pacientes normoalbuminúricos (tabla 15; $p<0,01$) situándose en el estadio 2 o 3 de daño renal. Esta disminución del IFGe se acompañó de un aumento significativo de la creatinina sérica que fue significativamente superior en los pacientes con

albuminuria resistente severa en comparación con los pacientes normoalbuminúricos (tabla 15; $p<0,001$) y con los pacientes con albuminuria resistente moderada (tabla 15; $p<0,01$).

Los niveles de colesterol y triglicéridos en sangre se mantuvieron dentro de los valores normales en los 3 grupos de pacientes, así como los niveles plasmáticos de renina y aldosterona.

Tabla 15. Datos demográficos de los pacientes incluidos en el estudio. Cada resultado representa la media \pm E.S., excepto para el ratio albúmina/creatinina que se expresa como la mediana y el correspondiente rango intercuartil entre paréntesis. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ respecto a los pacientes normoalbuminúricos; †† $p<0,01$; ††† $p<0,001$ respecto a los pacientes con albuminuria moderada.

Variable	Normoalbuminuria (n=17)	Albuminuria resistente	
		Moderada (n=14)	Severa (n=8)
Sexo (% hombres)	7 (41,2%)	8 (57,1%)	6 (87,5%)*
Edad (años)	62,24 \pm 8,807	65,7192 \pm 8,287	68,00 \pm 10,20
IMC (Kg/m ²)	29,29 \pm 3,846	30,31 \pm 3,649	28,44 \pm 2,376
PAS (mmHg)	129,3 \pm 33,36	127,3 \pm 18,57	147,1 \pm 23,55
PAD (mmHg)	86,32 \pm 10,69	81,48 \pm 9,754	86,19 \pm 14,48
PAS-24 horas (mmHg)	122,4 \pm 10,37	122,4 \pm 11,44	129,1 \pm 13,47
PAD-24 horas (mmHg)	81,38 \pm 16,58	75,79 \pm 8,997	75,88 \pm 12,39
Creatinina sérica (mg/dL)	0,8341 \pm 0,1253	0,9564 \pm 0,3179	1,339 \pm 0,4571 *** ††
Albúmina/creatinina (mg/g)	14,64 (1,832; 27,46)	76,84 (45,32; 108,4)***	1054 (467,5; 1641) *** †††
IFGe (mL/min/1.73m ²)	84,71 \pm 10,15	74,59 \pm 21,67	60,25 \pm 24,75 **
Colesterol LDL (mg/dL)	110,4 \pm 27,25	102,6 \pm 21,06	102,4 \pm 27,36
Colesterol HDL (mg/dL)	51,75 \pm 12,80	55,07 \pm 15,47	45,96 \pm 6,991
Colesterol total (mg/dL)	185,9 \pm 28,35	179,0 \pm 23,84	176,9 \pm 39,42
Triglicéridos (mg/dL)	118,0 \pm 51,72	106,6 \pm 40,09	141,8 \pm 69,92
25-hidroxicolecalciferol (ng/mL)	22,22 \pm 1,13	18,08 \pm 1,24*	16,40 \pm 2,01*
Renina (pg/mL)	19,69 \pm 4,80	13,13 \pm 2,83	30,43 \pm 12,04
Aldosterona (pg/mL)	258,9 \pm 19,16	236,8 \pm 25,78	311,0 \pm 96,91

Al igual que se observó en el modelo experimental de ratas espontáneamente albuminúricas (tabla 8), los niveles de 25-hidroxicolecalciferol fueron significativamente menores en los pacientes con albuminuria en comparación con los normoalbuminúricos. Así mismo, se observó una correlación significativa y negativa entre la concentración de 25-hidroxicolecalciferol y el logaritmo del cociente albúmina/creatinina de los pacientes (figura 39, $p=0,0327$; $r=-03670$), es decir, a medida que aumentaba la excreción urinaria de albúmina se observaron niveles más bajos de 25-hidroxicolecalciferol en plasma.

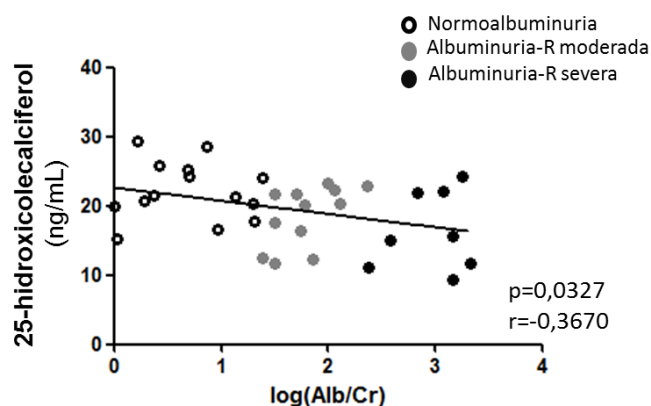


Figura 39. Correlación significativa y positiva entre la concentración de 25-hidroxicolecalciferol (ng/mL) y el logaritmo de cociente albumina/creatinina en pacientes normoalbuminúricos (n=14) y pacientes con albuminuria resistente (n=20). r de Pearson=0,5316; $p=0,0131$.

En cuanto al tratamiento pautado a los pacientes, en la tabla 16 se puede observar que el porcentaje de pacientes tratados con iECA y el porcentaje de pacientes tratados con ARAII fue similar dentro de cada grupo. Así mismo, un gran número de los pacientes dentro de cada uno de los tres grupos se encontraba en tratamiento antihipercolesterolemiante con estatinas. Esto indica que el tratamiento no influyó en el desarrollo de albuminuria en los pacientes.

Tabla 16. Porcentaje de pacientes con normoalbuminuria (n=17), albuminuria moderada (n=14) y albuminuria severa (n=8) tratados con estatinas, iECA y ARAII

Tratamiento	Normoalbuminuria	Albuminuria resistente	
		Moderada	Severa
iECA (%)	23%	21%	37%
ARA II (%)	77%	79%	63%
Estatinas (%)	71%	71%	88%

4.2 ESTUDIO DE LA RIGIDEZ ARTERIAL

Se estudió si la rigidez arterial estaba relacionada con la aparición de la albuminuria en pacientes hipertensos bajo supresión crónica de SRA. Para ello se determinó la VOP, parámetro que refleja rigidez arterial, observándose un aumento significativo de la misma en los pacientes con albuminuria resistente en comparación con los pacientes que presentaron normoalbuminuria (figura 40a; $p<0,05$). Dado que no se encontraron diferencias significativas

en los valores de VOP entre los pacientes con albuminuria resistente moderada y severa, se les incluyó en el mismo grupo, denominado como albuminuria resistente en la gráfica.

La media de los valores de la VOP en estos pacientes fue 9,45 m/s, considerándose 10 m/s el valor a partir del cual aparece rigidez arterial (ESH/ESC guidelines, 2013). Además se observa una correlación significativa y positiva entre el valor de VOP y el valor de albuminuria de los pacientes expresado como el logaritmo del cociente entre albúmina/creatinina (figura 40b; $r=0,5318$; $p=0,0131$).

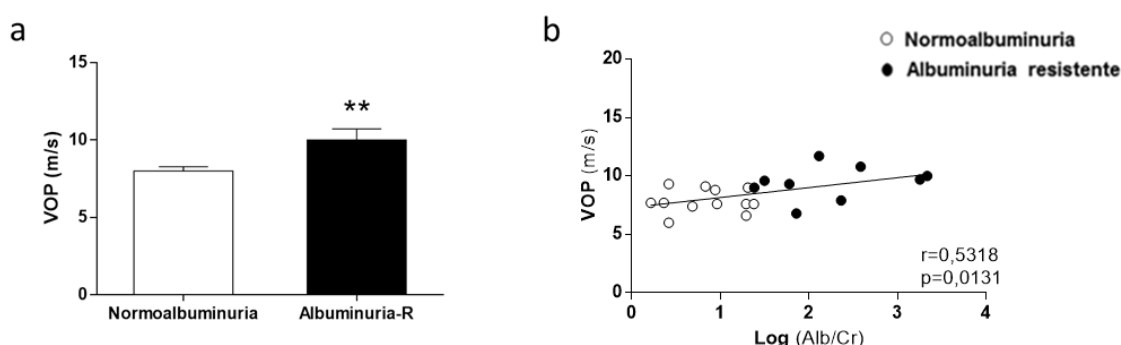


Figura 40. (a) Determinación de la VOP (m/s) en los pacientes normoalbuminúricos ($n=12$) en comparación con los pacientes que presentan albuminuria resistente ($n=9$) $**p<0,01$. Los valores se expresan como la media \pm E.S. (b) Correlación positiva entre la VOP (m/s) y el valor de albuminuria expresado como logaritmo del coeficiente albúmina/creatinina (r de Pearson= 0,5318; $p=0,0131$).

Aunque no se observaron diferencias significativas en la edad de los pacientes normoalbuminúricos y aquellos que presentaron albuminuria resistente, incluidos en el estudio, sí se observó una correlación significativa y positiva (figura 41) entre la VOP (m/s) y la edad de los pacientes (años), es decir a mayor edad de los pacientes, mayor valor de VOP.

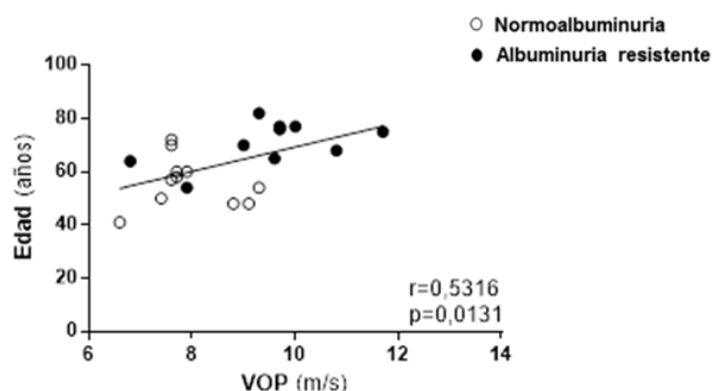


Figura 41. Correlación significativa y positiva entre la edad de los pacientes (años) y la VOP (m/s). r de Pearson=0,5316; $p=0,0131$.

El bloqueo del SRA permite el control de la hipertensión de los pacientes, pero no es capaz de impedir la aparición de marcadores de daño renal y vascular como son la albuminuria y el aumento de la velocidad de onda de pulso.

4.3 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE MARCADORES DE REMODELADO DE MATRIZ EXTRACELULAR

En la tabla 17 se muestra la concentración plasmática de distintos marcadores de remodelado de matriz extracelular.

Tabla 17. Determinaciones bioquímicas en plasma de marcadores de remodelado de matriz extracelular. Cada resultado representa la media \pm E.S. * $p < 0,05$ respecto a los pacientes normoalbuminúricos.

VARIABLE	Normoalbuminuria	Albuminuria resistente	
		Moderada	Severa
Desmosina (ng/mL)	0,08 \pm 0,01	0,11 \pm 0,02	0,11 \pm 0,03
PICP (ng/mL)	26,22 \pm 0,95	26,67 \pm 1,52	28,83 \pm 1,91
Colágeno tipo IV circulante (ng/mL)	72,2 \pm 13,2	103,2 \pm 36,8*	106,3 \pm 50,4*
MMP2 total (ng/mL)	5,7 \pm 2,2	6,9 \pm 1,9	6,5 \pm 1,7
MMP9 total (ng/mL)	1,4 \pm 0,7	1,1 \pm 0,4	0,8 \pm 0,4
Heparanasa (pg/mL)	503,7 \pm 70,21	473,8 \pm 52,31	557,3 \pm 130,20

El aumento significativo de la VOP en los pacientes albuminúricos se podría deber a un aumento en la degradación de elastina en las arterias, por lo que se estudió la concentración de desmosina en plasma. La desmosina es una molécula que se genera como consecuencia de

la degradación de la elastina y por lo tanto se puede utilizar como marcador de degradación de la misma. Sin embargo, no se obtuvieron diferencias significativas en la determinación de la concentración plasmática de desmosina (tabla 17).

Tampoco se observaron diferencias significativas en la concentración plasmática de propéptido C-terminal de procolágeno tipo I (PICP) que es un indicador de la síntesis de colágeno, por lo que este resultado sugiere que estos pacientes no presentan fibrosis. Sin embargo, la determinación de la concentración plasmática de colágeno tipo IV, como marcador de degradación de esta molécula, mostró un aumento significativo de su concentración en los pacientes con albuminuria resistente, tanto moderada (tabla 17; $p<0,05$) como severa (tabla 17; $p<0,05$). A pesar de este último resultado, la concentración plasmática de enzimas que degradan la matriz extracelular como son la heparanasa, y las MMPs, tanto MMP2 como MMP9 no mostró diferencias significativas entre los grupos de pacientes incluidos en el estudio (tabla 17).

4.4 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE MMP2 Y MMP9 EN PLASMA

Dado que como indica la tabla anterior, se observó un aumento en la degradación de colágeno tipo IV en los pacientes con albuminuria, pero no se observaron diferencias significativas en la concentración plasmática de la MMP2 ni de la MMP9, se estudió si el aumento en la degradación de esta molécula se debía a un aumento de la actividad de las gelatinasas.

Como se observa en la figura 42, tanto la actividad gelatinasa de la MMP2 (panel b de la figura 42) como de MMP9 (panel c de la figura 42) determinadas por zimografía en gel de poliacrilamida, se vieron significativamente aumentadas en el plasma de pacientes con albuminuria resistente tanto moderada ($p<0,001$ para MMP2; $p<0,01$ para MMP9) como severa ($p<0,01$ para MMP2 y $p<0,05$ para MMP9) en comparación con el grupo de pacientes normoalbuminúricos.

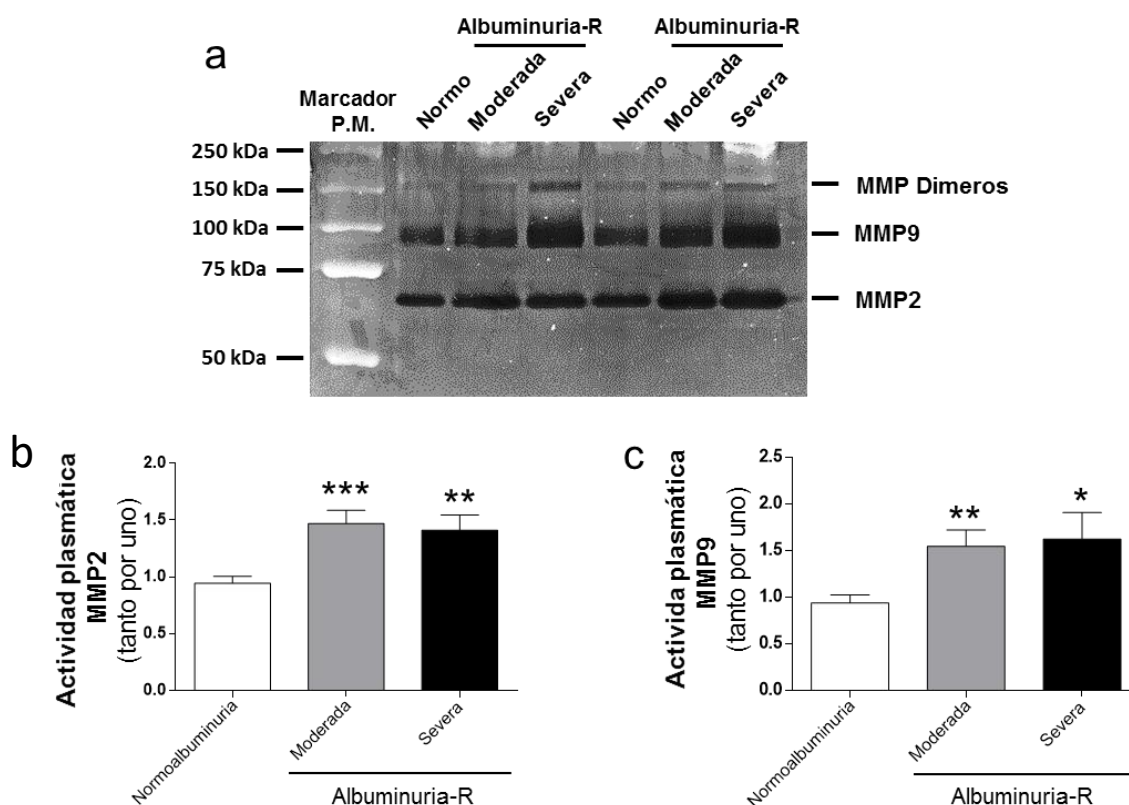


Figura 42. Estudio de la actividad de la MMP2 y de la MMP9 en plasma de pacientes. El panel superior muestra un gel de zimografía representativo de la actividad gelatinasa MMP2 y MMP9. Los paneles inferiores muestran el análisis densitométrico de la actividad gelatinasa MMP2 (b) y MMP9 (c) expresado en tanto por uno frente al grupo de pacientes normoalbuminúricos ($n=17$; que se representa con el valor de uno) en ambas gráficas en comparación con los pacientes con albuminuria resistente, tanto moderada ($n=13$) como severa ($n=7$). Los datos se expresan como la media \pm E.S. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ frente al grupo de pacientes normoalbuminúricos. Marcador P.M. corresponde a Marcador de Peso Molecular.

En el gel de zimografía (panel a de la figura 42) sólo se observaron 3 bandas, una correspondiente a la actividad gelatinasa de la MMP2 (banda inferior) y otra banda correspondiente a la actividad gelatinasa de la MMP9 (banda intermedia) y una banda superior correspondiente a las formas diméricas de las MMPs. Por lo tanto, no se pudo determinar mediante esta técnica si la banda observada correspondía a la forma activa o al zimógeno activado por el SDS durante la electroforesis. Por esta razón, se determinó la concentración de MMP2 y MMP9 activas en las muestras de plasma de los pacientes utilizando para ello un inmunoensayo específico y comercial.

Los resultados de la figura no mostraron diferencias significativas en la concentración de MMP2 activa (figura 43a), pero sí un aumento significativo de la MMP9 activa en los pacientes con albuminuria resistente en comparación con los pacientes normoalbuminúricos (figura 43b; $p<0,01$ para los pacientes con albuminuria resistente moderada en comparación con los

pacientes normoalbuminúricos, y $p < 0,001$ para MMP9 activa en los pacientes con albuminuria resistente severa comparación con los pacientes normoalbuminúricos). Este aumento en la MMP9 activa fue incluso mayor en pacientes con albuminuria resistente severa en comparación con los que presentaban albuminuria resistente moderada (figura 43b, $p < 0,01$ para la MMP9 activa).

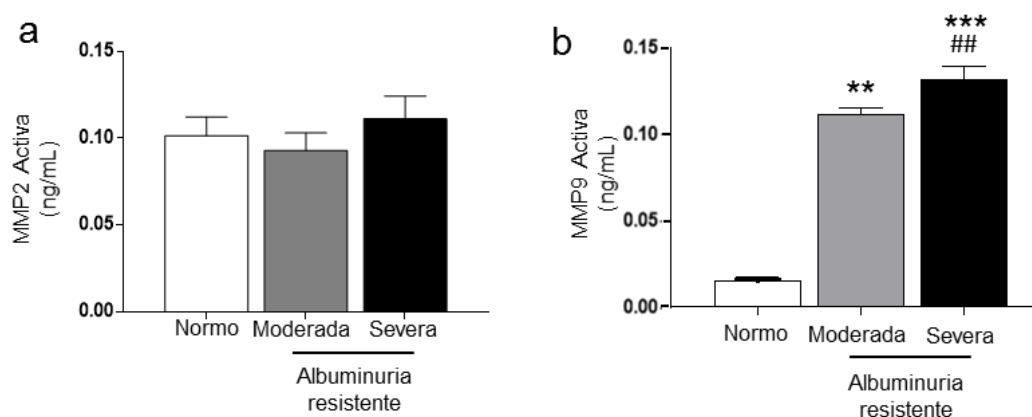


Figura 43. Determinación de la concentración de MMP2 (a) y de la MMP9 (b) activas (expresado en ng/mL de proteína activa) en las muestras de plasma de pacientes. En ambas gráficas se representa el grupo de pacientes normoalbuminúricos ($n=17$) en comparación con los pacientes con albuminuria resistente, tanto moderada ($n=13$) como severa ($n=7$). Los datos se expresan como la media \pm E.S. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ frente al grupo de pacientes normoalbuminúricos; ## $p < 0,01$ frente al grupo de pacientes con albuminuria resistente moderada.

4.5 DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE TIMP1

Puesto que no se encontraron diferencias significativas en la concentración plasmática de MMP9 en ninguno de los grupos de pacientes (tabla 17), pero sí se observó un aumento significativo en la actividad de esta metaloproteasa en los pacientes con albuminuria resistente (figura 42 y 43), se realizó un estudio de la expresión de su inhibidor, TIMP1, para determinar si una disminución en la expresión del mismo era la causa del aumento en la actividad de MMP9. Sin embargo, como se muestra en la figura 44 no se observaron diferencias significativas en la expresión de TIMP1, inhibidor de MMP9, entre los pacientes normoalbuminúricos y los pacientes con albuminuria resistente, tanto moderada, como severa.

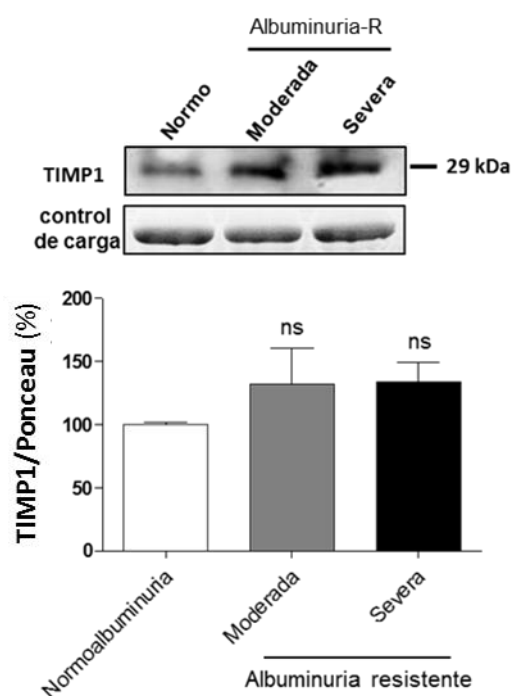


Figura 44. Estudio de la expresión de TIMP1 mediante Western Blot. El panel superior muestra un blot representativo de la expresión en plasma de TIMP1. El panel inferior muestra el análisis densitométrico del mismo. Como control de carga se utilizó la tinción con Ponceau S. Los valores se expresan como % frente al grupo de pacientes normoalbuminúricos (n=8) que se representa como 100% en comparación con los pacientes con albuminuria resistente, tanto moderada (n=7) como severa (n=7). Los datos se expresan como la media \pm E.S.

El aumento de la actividad de MMP9 es independiente de la concentración de esta proteasa y de la expresión de su inhibidor TIMP1. Esto indica que la determinación exclusiva de la concentración de MMP9, puede desestimar su actividad real en estados patológicos como la albuminuria resistente al bloqueo del SRA.

4.6 ESTUDIO DE LA RELACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE MMP9 CON LOS MARCADORES DE DAÑO RENAL Y VASCULAR OBSERVADOS EN PACIENTES

Con los resultados obtenidos, se observó una correlación positiva entre el grado de albuminuria que presentaron los pacientes (expresado como el logaritmo del cociente entre albumina/creatinina) y la actividad de MMP9 determinada tanto por zimografía (figura 45a; r=

0,5285; $p=0,0008$) como por el inmunoensayo (figura 45b; $r=0,6563$; $p<0,0001$), de tal manera, que al aumentar el grado de albuminuria, aumentó la actividad de MMP9 en plasma.

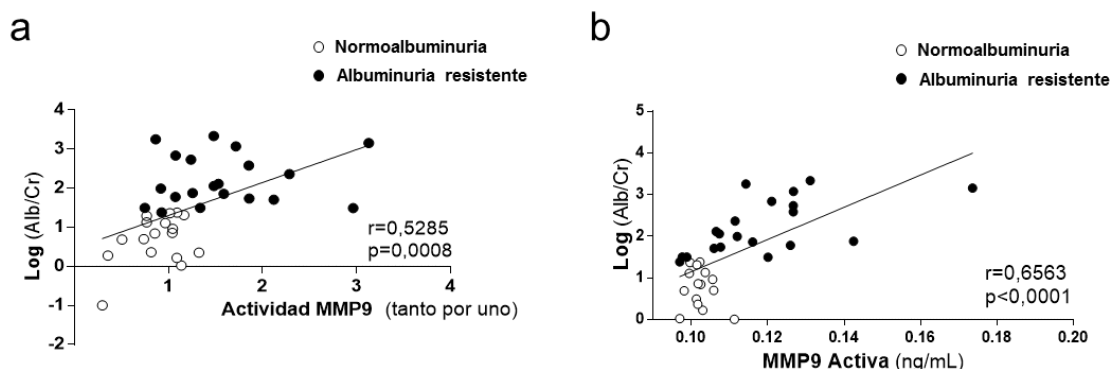


Figura 45. Correlación positiva entre el grado de albuminuria que presentan los pacientes expresado como el logaritmo del cociente albúmina/creatinina y (a) la actividad de MMP9 plasmática determinada por zimografía (expresado en tanto por uno; r de Pearson= 0,5285; $p=0,0008$) y (b) la concentración plasmática de MMP9 activa determinada por ELISA (expresado en ng/mL; r de Pearson=0,6563; $p<0,0001$) en pacientes normoalbuminúricos, representados en la gráfica como puntos blancos ($n=17$) y pacientes con albuminuria resistente tanto moderada ($n=13$) como severa ($n=7$), representados ambos por puntos negros.

Se observó también una correlación negativa entre el IFGe y la concentración de MMP9 activa determinada mediante inmunoensayo y expresado como ng/mL de proteína activa, (figura 46; $r=-0,5072$; $p=0,0022$) de tal manera, que al disminuir el IFGe, aumentó la concentración de MMP9 activa.

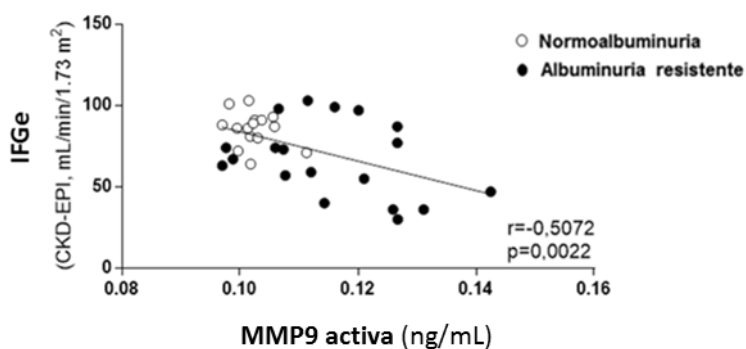


Figura 46. Correlación negativa entre el índice de filtrado glomerular calculado mediante la fórmula CKD-EPI (mL/min/1,73 m²), y la concentración plasmática de MMP9 activa determinada mediante inmunoensayo expresada como ng/mL de proteína activa (r de Pearson= -0,5072; $p=0,0022$) en pacientes normoalbuminúricos, representados en la gráfica como puntos blancos ($n=17$) y pacientes con albuminuria resistente tanto moderada ($n=13$) como severa ($n=7$), representados ambos por puntos negros.

Así mismo, se obtuvo una correlación positiva y significativa entre la concentración de MMP9 activa (ng/mL) y la VOP de los pacientes (m/s), de tal manera, que a mayor actividad MMP9, mayor VOP (figura 47; $r=0,4802$; $p=0,037$).

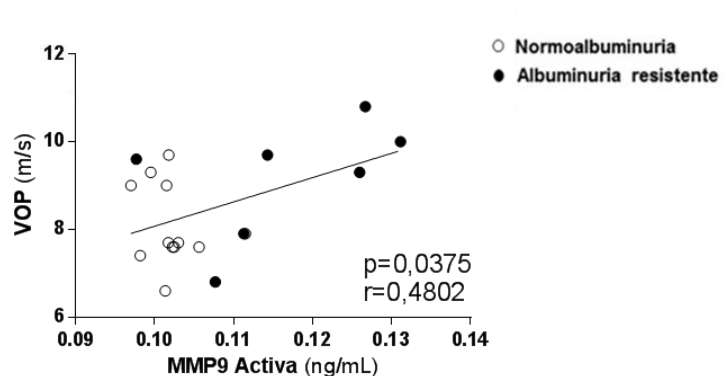


Figura 47. Correlación positiva entre la VOP (m/s) y la concentración de MMP9 activa en ng/mL de pacientes normoalbuminúricos (señalados en la gráfica con puntos blancos; $n=11$) en comparación con los pacientes que presentan albuminuria resistente (señalados en la gráfica como puntos negros; $n=7$) (r de Pearson= $0,4802$; $p=0,0375$).

Por otro lado, como indica la figura 48 se observó además una correlación significativa entre la actividad de MMP9 determinada mediante zimografía y la concentración de colágeno tipo IV circulante en plasma, como indicador de la degradación de esta macromolécula en tejido (figura 48; $p=0,0371$; $r=0,3538$)

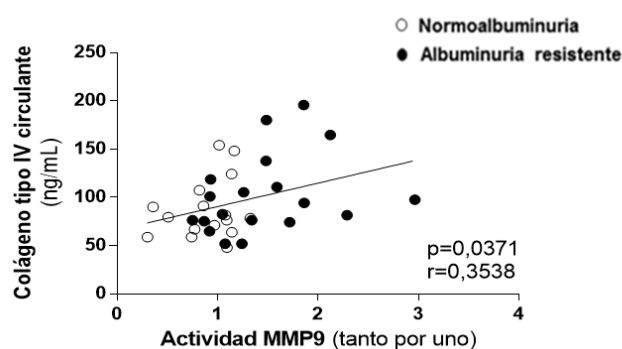


Figura 48. Correlación positiva entre la concentración de colágeno tipo IV circulante en plasma (ng/mL) y la actividad de MMP9 determinada mediante zimografía (tanto por uno) de pacientes normoalbuminúricos (señalados en la gráfica con puntos blancos; $n=16$) en comparación con los pacientes que presentan albuminuria resistente (señalados en la gráfica como puntos negros; $n=20$) (r de Pearson= $0,3538$; $p=0,0371$).

A fin de determinar si el tratamiento antihipertensivo pautado a los pacientes influía sobre la actividad de MMP9 se separó actividad gelatinasa de esta proteasa determinada por zimografía, en función del tipo de bloqueo del SRA con el que se trató a los pacientes. Como se

observa en la siguiente gráfica no hubo diferencias significativas en la actividad de MMP9 en función del tratamiento ni en el grupo de pacientes normoalbuminúricos y ni en el grupo de pacientes que presentaban albuminuria resistente. Con lo que se puede concluir, que el tratamiento antihipertensivo de los pacientes o bien iECAs o bien ARA II no influye en la actividad de MMP9 ni en los pacientes con normoalbuminuria ni en aquellos que presentan albuminuria resistente (figura 49).

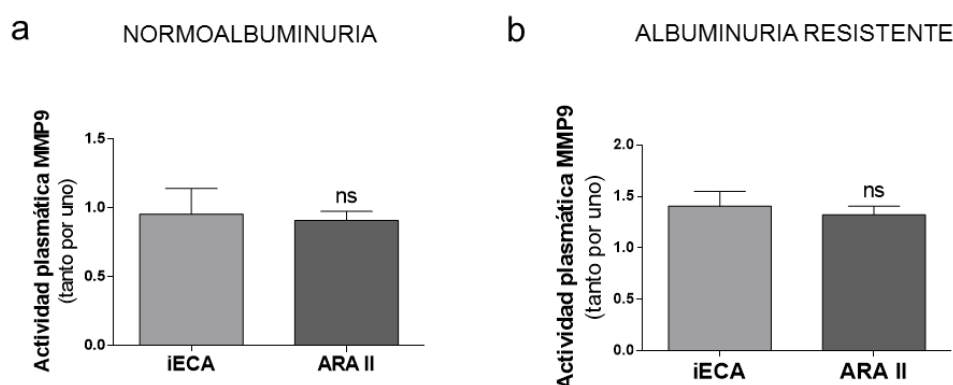


Figura 49. Efecto del bloqueo de RAS sobre la actividad plasmática MMP9 determinada por zimografía, expresada en tanto por uno, en pacientes normoalbuminúricos (a) y pacientes con albuminuria resistente (b). Los valores se expresan como la media \pm E.S.

En los pacientes con albuminuria resistente la actividad plasmática de MMP9 aumenta a medida que lo hace la albuminuria y disminuye el índice de filtrado glomerular. Este aumento en la actividad de MMP9 es independiente del tipo de bloqueo del SRA con el que se trate a los pacientes.

4.7 DETERMINACIÓN DE MARCADORES DE DAÑO OXIDATIVO EN PACIENTES

4.7.1 DETERMINACIÓN DEL GRADO DE OXIDACIÓN DE LAS PROTEÍNAS PLASMÁTICAS

Dado que no se observaron diferencias en la concentración de TIMP1, y que se ha descrito que un aumento del estrés oxidativo puede producir un aumento en la actividad de las MMPs (Rajagopalan y cols., 1996), se determinó la concentración de grupos carbonilos en las proteínas plasmáticas, como marcador de daño oxidativo. Este estudio mostró un aumento significativo en la concentración de carbonilos plasmáticos en pacientes con albuminuria

resistente, tanto moderada (figura 50; $p<0,01$) como severa (figura 50; $p<0,05$) en comparación con los pacientes normoalbuminúricos.

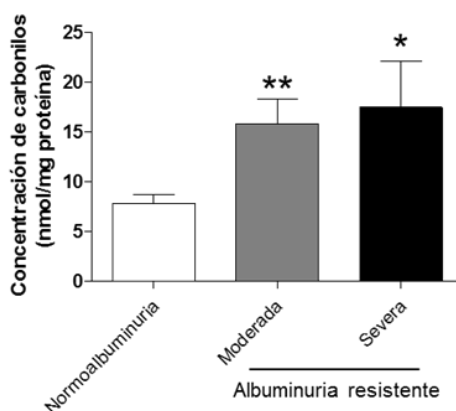


Figura 50. Estudio de la carbonilación de proteínas plasmáticas (expresado en mmol de carbonilos por mg total de proteína) en pacientes normoalbuminúricos ($n=17$) y pacientes con albuminuria resistente, tanto moderada ($n=14$), como severa ($n=8$). Los datos se expresan como la media \pm E.S. * $p<0,05$; ** $p<0,01$ frente al grupo de pacientes normoalbuminúricos.

Además, se observó una correlación negativa y significativa entre la concentración de 25-hidroxicoalciferol y los valores de concentración de carbonilos en plasma en los pacientes, de tal manera, que a medida que disminuyen los valores de concentración de 25-hidroxicoalciferol, aumenta la concentración de carbonilos en plasma (figura 51a; $r=0,3955$; $p=0,0042$). Así mismo, se observó una correlación positiva entre la actividad de MMP9 determinada por zimografía y la carbonilación de las proteínas plasmáticas (figura 51b; $r=0,4479$; $p=0,0337$) de tal manera, que al aumentar la concentración de carbonilos en plasma, aumenta la actividad gelatinasa de MMP9.

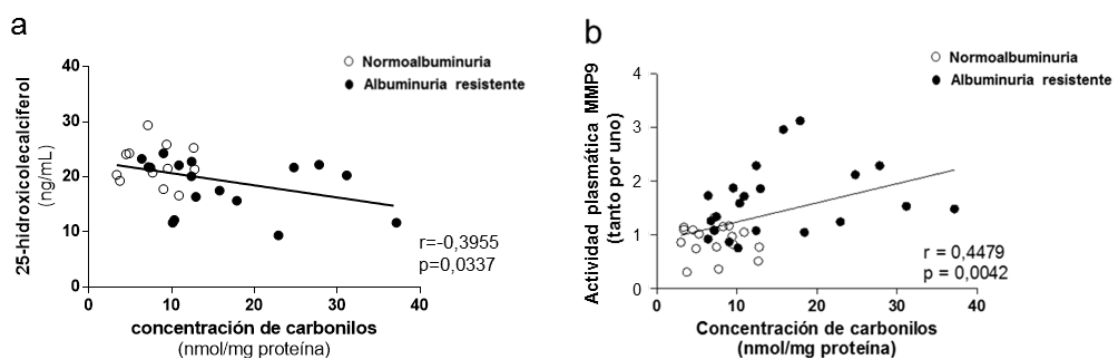


Figura 51. (a) Correlación negativa entre la concentración de 25-hidroxicoalciferol (ng/mL) y los valores de concentración de carbonilos en plasma (nmol/mg proteína) de pacientes normoalbuminúricos (círculos blancos) y pacientes con albuminuria resistente (círculos negros); (r de Pearson= $-0,3955$; $p=0,0337$) (b) Correlación positiva

entre la actividad plasmática de MMP9 determinada mediante zimografía (tanto por uno) y la concentración de carbonilos en plasma (nmol/mg proteína) de pacientes normoalbuminúricos (círculos blancos) y pacientes con albuminuria resistente (círculos negros); (r de Pearson=0,4479; $p=0,0042$).

Se estudió también la carbonilación de proteínas plasmáticas por *Western Blot* mediante la derivatización de las mismas con DNPH y su posterior detección con el anticuerpo contra DNP. Se observó un aumento de la intensidad de las bandas en las muestras de pacientes con albuminuria resistente, en comparación con los pacientes normoalbuminúricos (figura 52; $p<0,01$). Lo cual corrobora que en los pacientes albuminúricos existe un aumento en la oxidación de las proteínas plasmáticas totales en comparación con los normoalbuminúricos. Además, como se puede observar en el panel superior de la figura aparece una banda bien definida a la altura de 29 KDa, peso molecular que corresponde al peso molecular del TIMP1.

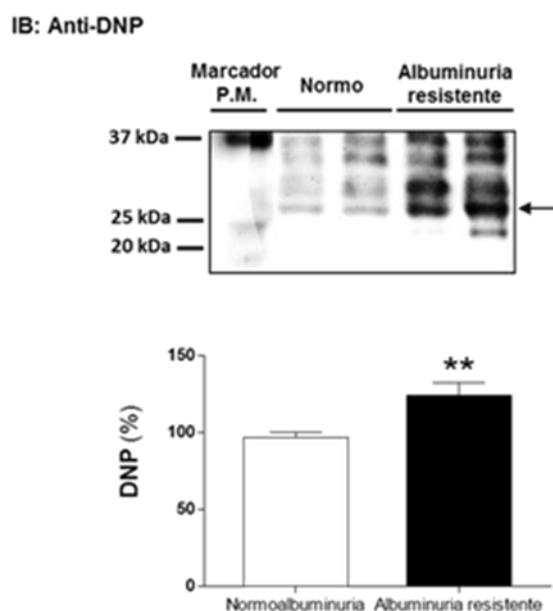


Figura 52. Estudio mediante Western Blot de la carbonilación de proteínas plasmáticas previamente derivatizadas con DNPH y detectadas con un anticuerpo contra DNP, en pacientes normoalbuminúricos y pacientes con albuminuria resistente, ($n=5$). En el panel superior se muestra un blot representativo y en el panel inferior el análisis densitométrico. La flecha señala la banda cuyo peso molecular corresponde a 29 KDa. Los datos se expresan como la media \pm E.S. (** $p<0,01$ frente al grupo de pacientes normoalbuminúricos). Marcador P.M. corresponde a Marcador de Peso Molecular.

4.7.2 DETERMINACIÓN DE LA OXIDACIÓN DE TIMP1

En la banda que aparece señalada por una flecha en el panel superior de la figura anterior a la altura de 29 KDa (figura 52), se observa el mismo patrón de aumento de la intensidad de señal en los pacientes con albuminuria resistente, en comparación con los

normoalbuminúricos, lo cual se traduce en un aumento de la oxidación. Para determinar si esta banda corresponde al inhibidor de MMP9, que presenta el mismo peso molecular, se realizó una inmunoprecipitación de TIMP1, seguida de la derivatización con DNPH del mismo y su posterior detección con el anticuerpo contra DNP. Como control de carga se utilizó la expresión total de TIMP1 en la muestra.

Como se observa en la figura 53, en el plasma de los pacientes con albuminuria resistente, hay un aumento significativo en la intensidad de la señal y por lo tanto, en la oxidación del inhibidor TIMP1 en comparación con los pacientes normoalbuminúricos (figura 53; $p<0,5$).

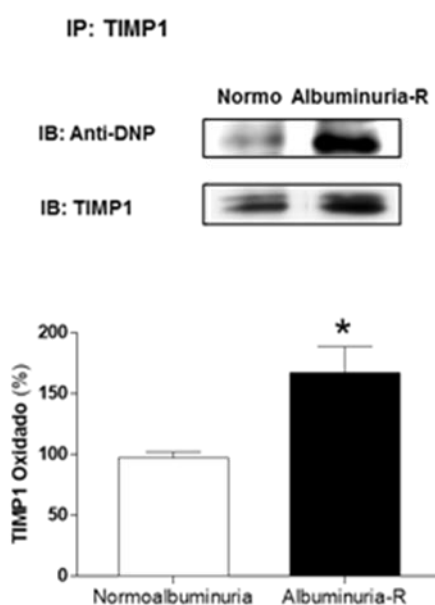


Figura 53. Estudio de la oxidación de TIMP1 en pacientes normoalbuminúricos y pacientes con albuminuria resistente, ($n=3$). En el panel superior se muestran *blots* representativos de la inmunoprecipitación de TIMP1 y su posterior detección o bien, con el anticuerpo contra DNP tras su derivatización con DNPH (IB: Anti-DNP) para determinar la oxidación del inhibidor, o bien con el anticuerpo contra TIMP1 (IB: TIMP1) para su uso como control de carga. En el panel inferior se muestra el análisis densitométrico de los mismos. Los datos se expresan como la media \pm E.S. * $p<0,05$ frente al grupo de pacientes normoalbuminúricos.

4.8 ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE MMP9 Y SU INHIBIDOR ENDÓGENO TIMP1

Los resultados anteriores mostraron un aumento de la actividad de la MMP9 en los pacientes con albuminuria resistente, tanto moderada como severa (figura 42), a pesar de que su expresión (tabla 17) ni la de su inhibidor TIMP1 (figura 44) estaban modificadas. Para determinar si la oxidación de TIMP1 se traducía en una menor inhibición de MMP9, debido a una disminución de la interacción de ambas proteínas, se desarrolló y optimizó un ensayo de interacción utilizando la tecnología AlphaLISA. Previo al estudio de la interacción

MMP9/TIMP1 en el plasma de los pacientes, se puso a punto la técnica con las proteínas MMP9 y TIMP1 recombinantes humanas, para determinar la idoneidad del ensayo en el estudio de esta interacción concreta.

4.8.1 VALIDACIÓN DEL ESTUDIO DE INTERACCIÓN MMP9/TIMP1 CON PROTEÍNAS RECOMBINANTES HUMANAS

Tras realizar este ensayo se observó que la interacción entre MMP9 y TIMP1 era detectable con el protocolo desarrollado utilizando la tecnología AlphaLISA. Como se observa en la figura 54, la interacción se detecta desde la menor concentración de proteína y va aumentando al aumentar la concentración de las mismas hasta llegar a un máximo de señal a la concentración de 3 $\mu\text{g/mL}$ de las proteínas recombinantes. A partir de esta concentración la señal de interacción entre las dos proteínas comienza a disminuir.

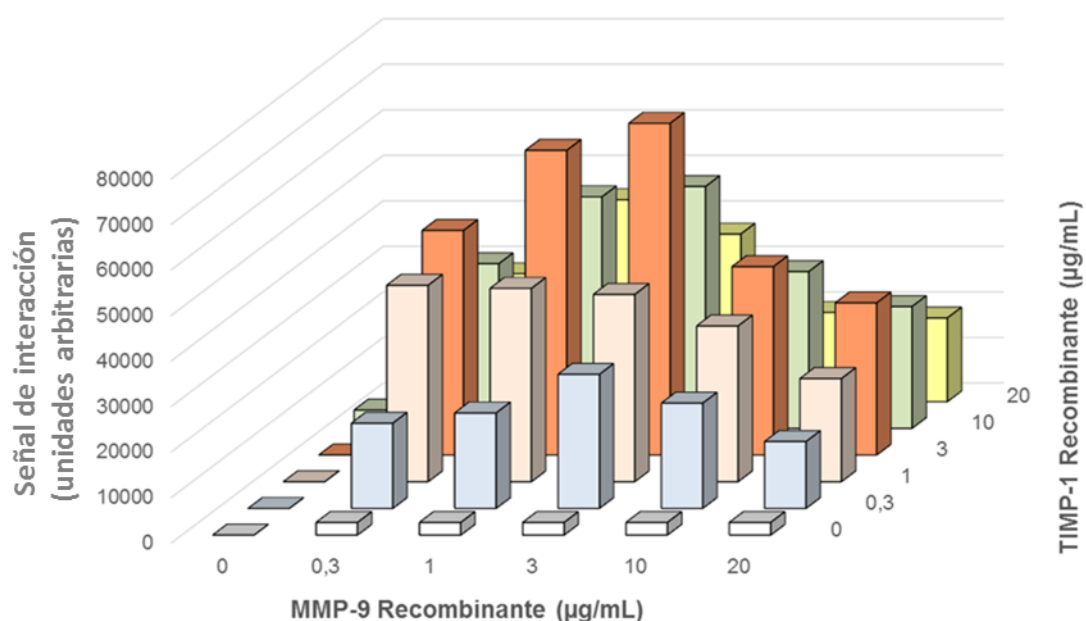


Figura 54. Gráfica de señal de interacción entre concentraciones crecientes (de 0 a 20 $\mu\text{g/mL}$) de proteínas recombinantes humanas MMP9 y TIMP1.

4.8.2 DETERMINACIÓN DE LA INTERACCIÓN DE MMP9/TIMP1 EN PLASMA DE PACIENTES

Una vez puesta a punto la técnica con proteínas recombinantes humanas, se procedió a determinar la interacción entre MMP9 y TIMP1 en el plasma de los pacientes. Tras analizar los resultados obtenidos en este estudio, se observó una disminución significativa de la intensidad de la señal, lo cual se traduce en una disminución en la interacción de la pareja MMP9/TIMP1

(figura 55; $p < 0,01$) en el plasma de los pacientes con albuminuria resistente en comparación con los pacientes normoalbuminúricos. Esta disminución de la interacción entre la MMP9 y su inhibidor, observada mediante este estudio, puede explicar el aumento de la actividad de esta proteasa en los pacientes con albuminuria resistente pese a que ni su concentración ni la expresión de su inhibidor estaban modificadas en estos pacientes.

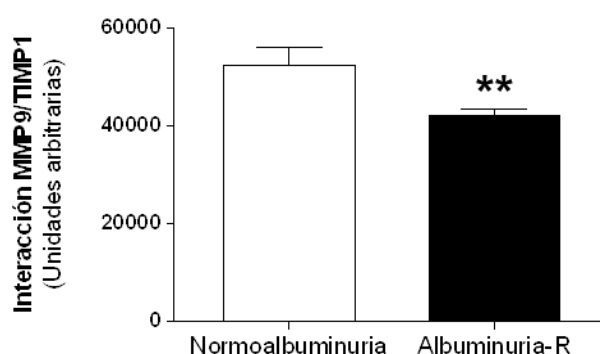


Figura 55. Estudio de la interacción entre MMP9/TIMP1 en muestras de plasma de pacientes normoalbuminúricos ($n=16$) y pacientes con albuminuria resistente ($n=20$). Los datos se expresan como la media \pm E.S. ** $p < 0,01$ frente al grupo de pacientes normoalbuminúricos.

El aumento de la actividad de MMP9 en plasma de los pacientes con albuminuria resistente se debe posiblemente a un aumento en el estatus oxidativo de estos pacientes. Este aumento del estrés oxidativo favorece la oxidación de TIMP1, lo que se traduce en una disminución en la interacción entre la MMP9 y su inhibidor.

4.9 ESTUDIO DE LAS MICROPARTÍCULAS PRESENTES EN PLASMA DE PACIENTES

Se sabe que casi todos los tipos celulares del organismo son capaces de generar micropartículas como respuesta a un daño. Tanto la albuminuria como el aumento de estrés oxidativo son marcadores de daño endotelial, y van acompañadas por un aumento de la respuesta inflamatoria del organismo. Por lo tanto, se estudió el número total de micropartículas en plasma de los pacientes y posteriormente el número de micropartículas procedentes de CE y células inflamatorias.

4.9.1 DETERMINACIÓN DEL NÚMERO TOTAL DE MICROPARTÍCULAS EN PLASMA

La determinación por citometría de flujo del número de micropartículas totales en las muestras de plasma mediante el marcaje de los residuos de fosfatidilserina de las mismas con

anexina V en presencia de calcio, no mostró diferencias significativas entre los pacientes normoalbuminúricos y los pacientes con albuminuria resistente (figura 56).

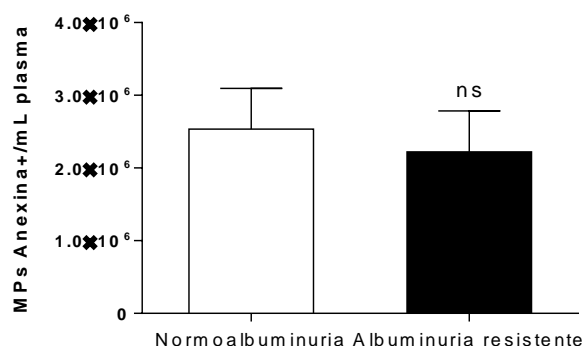


Figura 56. Número total de micropartículas determinadas por citometría de flujo en plasma de pacientes normoalbuminúricos (n=11) y pacientes con albuminuria resistente (n=14). Se consideran micropartículas aquellas que muestran un marcaje positivo para anexina V en presencia de Ca^{2+} . Los datos se expresan como la media \pm E.S.

Dado que los pacientes con albuminuria resistente presentaron un aumento en la VOP, que se traduce en un daño vascular, se analizó la correlación entre los valores de VOP de los pacientes y el número total de micropartículas contenidas en plasma, observándose una correlación significativa y positiva entre ambos valores (figura 57).

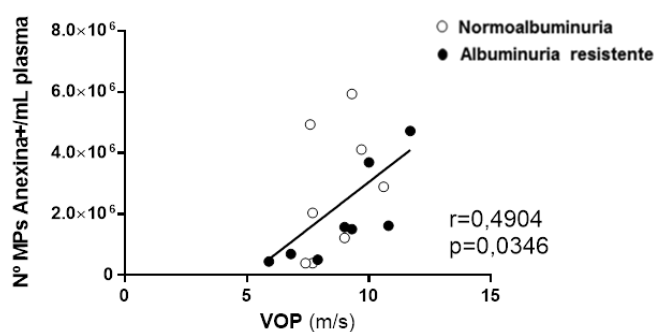


Figura 57. Correlación positiva entre el valor de VOP (m/s) y el número total de micropartículas totales en plasma de pacientes normoalbuminúricos (n=8) y pacientes con albuminuria resistente (n=8) determinado por citometría de flujo (r de Pearson=0,4904; p =0,0346)

4.9.2 ESTUDIO DE LA PROCEDENCIA CELULAR DE LAS MICROPARTÍCULAS

Se determinó en muestras de plasma de los pacientes el número de micropartículas procedentes de CE, es decir aquellas que presentaban un marcaje CD31+ y CD42-. No se observaron diferencias significativas en el número de micropartículas procedentes de CE de

pacientes normoalbuminúricos y aquellos que presentan albuminuria resistente (figura 58a). Tampoco se obtuvieron diferencias significativas en el número de micropartículas procedentes de monocitos (aquellas que presentaban un marcaje CD14+) entre las muestras de pacientes normoalbuminúricos en comparación con los pacientes con albuminuria resistente (figura 58b).

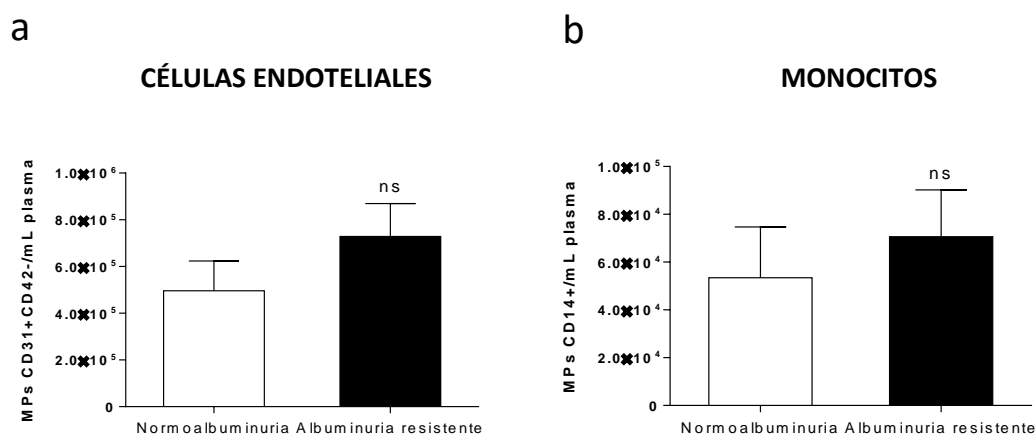


Figura 58. Determinación por citometría de flujo del número de micropartículas derivadas de CE (aquellas con marcaje CD31+/CD42-) (a) y derivadas de monocitos (aquellas con marcaje CD14+) (b) en muestras de plasma de pacientes normoalbuminúricos (n=11) en comparación con pacientes con albuminuria resistente (n=14). Los datos se expresan como la media ± E.S.

4.9.3 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO PROTEICO DE LAS MICROPARTÍCULAS AISLADAS DE PLASMA DE PACIENTES

4.9.3.1 Determinación del contenido en MMP9

Se sabe que las micropartículas procedentes de células inflamatorias y de CE activadas como consecuencia de un proceso patológico son una fuente de MMPs. Dado que los resultados anteriores demuestran la existencia en plasma de micropartículas procedentes de estos tipos celulares, se estudió si las micropartículas aisladas del plasma de los pacientes podían ser una fuente de MMPs.

El *Western Blot* realizado para determinar si las micropartículas extraídas del plasma de los pacientes contenían MMP9, mostró dos bandas, una a 92 KDa, correspondiente a la proenzima pro-MMP9, y otra banda a 82 KDa, correspondiente a la forma activa de MMP9. Aunque no se observaron diferencias significativas en el contenido de MMP9 entre los pacientes normoalbuminúricos y aquellos que presentan albuminuria resistente, este resultado sugiere que una de las fuentes de MMP9 son las micropartículas circulantes (figura 59).

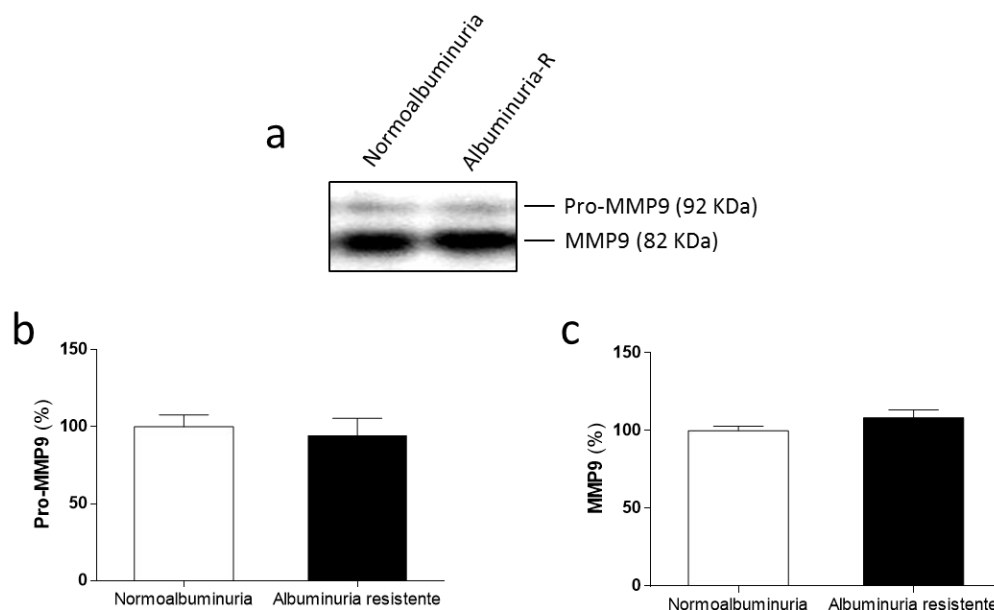


Figura 59. Determinación del contenido en MMP9 de las micropartículas extraídas de plasma de pacientes. El panel superior (a) muestra un blot representativo de la expresión tanto de la forma pro-MMP9 (92KDa) como de la forma activa MMP9 (82KDa). En los paneles inferiores se muestra el análisis densitométrico de la expresión de pro-MMP9 (b) y de MMP9 (c) en pacientes normoalbuminúricos (n=12), en comparación con pacientes con albuminuria resistente (n=13). Los datos se expresan como la media \pm E.S.

4.9.3.2 DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN NOX5

Dado que tanto en pacientes con albuminuria resistente (figura 50) como en las ratas MWF se observó un aumento del estrés oxidativo (figura 25), que en estas últimas se debía en parte a un aumento de la actividad de NADPH oxidasa a nivel renal, se estudió si las micropartículas extraídas de plasma de pacientes eran una fuente de NADPH. En concreto, se estudió la expresión de NOX5 ya que se sabe que tiene un papel importante a nivel renal.

Se observó la expresión de NOX5 en las micropartículas extraídas de plasma tanto de pacientes normoalbuminúricos como de aquellos que presentaban albuminuria resistente. Este resultado mostró que una de las fuentes de NOX5 a nivel plasmático son las micropartículas circulantes, aunque no se hallaron diferencias significativas en el contenido de esta proteína en las micropartículas (figura 60) de pacientes con albuminuria resistente en comparación con pacientes normoalbuminúricos.

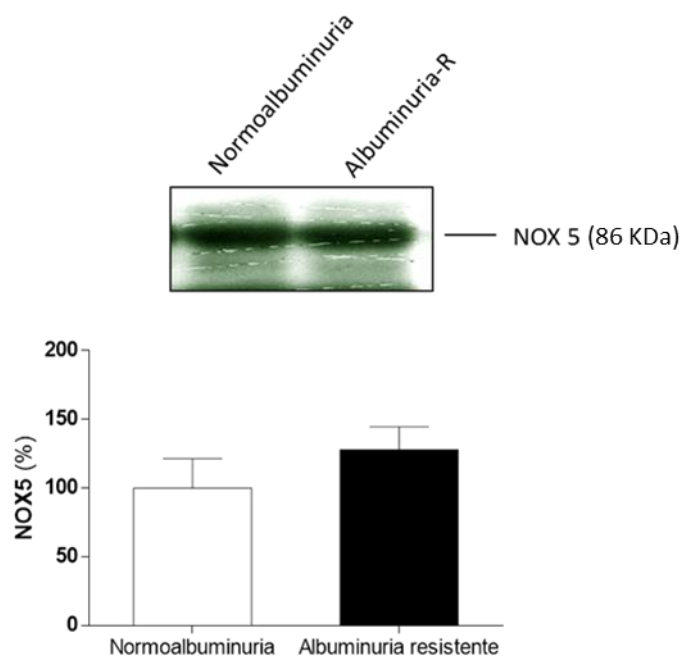


Figura 60. Determinación del contenido en NOX5 de las micropartículas extraídas de plasma de pacientes. El panel superior muestra un blot representativo de la expresión de NOX5. En los paneles inferiores se muestra el análisis densitométrico en pacientes normoalbuminúricos (n=12), en comparación con pacientes con albuminuria resistente (n=13). Los datos se expresan como la media \pm E.S.

A pesar de que no se observaron diferencias significativas en el número ni el contenido en pro-MMP9, MMP9, y NOX5 de las micropartículas entre los grupos de pacientes de este estudio, estos resultados confirman que las micropartículas circulantes en plasma son una fuente de MMP9 y NOX5.

DISCUSIÓN

Según la guía realizada por la Sociedad Europea de Hipertensión y la Sociedad Europea de Cardiología para el manejo de la hipertensión arterial, el bloqueo del SRA es la principal estrategia terapéutica utilizada en el tratamiento de la hipertensión (ESH/ESC, 2013). La disminución de la presión arterial cuando ésta se encuentra patológicamente elevada evita el posible desarrollo de otras enfermedades CV como pueden ser el infarto de miocardio, ictus, etc. (Lucisano y cols., 2013). Además de los efectos beneficiosos en el control de la presión arterial, el bloqueo del SRA es capaz de disminuir la excreción urinaria de albúmina, que es un marcador de riesgo tanto de enfermedades CV como renales (Rojas-Rivera y cols., 2012). Sin embargo, recientemente se ha descrito que pacientes con un buen control de la presión arterial debido al tratamiento farmacológico con iECAS o con ARAI, pueden desarrollar albuminuria resistente o escape de albuminuria (Cerezo y cols., 2012). Dado el gran valor pronóstico de la albuminuria tanto en el desarrollo, como en la progresión de la enfermedad renal y CV (Cerasola y cols., 2010), se ha puesto de manifiesto la importancia de buscar nuevos marcadores asociados a su desarrollo con la finalidad de predecir lo antes posible su aparición, mejorar la estratificación de pacientes en riesgo de padecer este tipo de enfermedades y generar nuevas estrategias para poder realizar un tratamiento individualizado según las características de cada paciente (Berezin y cols., 2015). En este contexto, las ratas Munich Wistar Frömter, suponen un valioso modelo de desarrollo espontáneo de albuminuria, en el que llevar a cabo estos estudios especialmente sobre uno de los órganos diana de la albuminuria como es el riñón, al cual, por razones éticas no se pudo acceder en los pacientes con albuminuria resistente.

1. La albuminuria está asociada con la disfunción endotelial y con un aumento del estrés oxidativo tanto vascular como renal

En el presente trabajo las ratas con albuminuria presentaron una disminución significativa de la respuesta vasodilatadora a ACh (figura 21). Estos resultados obtenidos del estudio de la función vascular en las ratas MWF concuerdan con publicaciones previas en las que se asocia la albuminuria con la disfunción endotelial (Abdelhafiz y cols., 2011). En nuestro estudio se observó que la disfunción endotelial en este modelo animal se debía probablemente a la combinación del efecto de prostanoïdes vasoconstrictores (figura 23) y de la disminución de la biodisponibilidad de NO a nivel vascular (figura 22). La contribución de los prostanoïdes vasoconstrictores a la disfunción endotelial observada en el modelo experimental de ratas MWF es controvertida, ya que existen estudios como éste, en los que se observa el efecto de los mismos sobre la respuesta vasodilatadora (Ulu y cols., 2009), mientras que otros estudios

no observan el efecto de estos vasoconstrictores (Stereif y cols., 2012). En cuanto a la disminución de la biodisponibilidad de NO, uno de los posibles mecanismos implicados en la misma es un aumento del estrés oxidativo, ya que las EROs son capaces de reaccionar con esta molécula (Lezza y cols., 1994). En este sentido realizamos una determinación de $O_2^{\cdot-}$ en la aorta de las ratas MWF, mediante el cual, observamos un aumento del $O_2^{\cdot-}$ en los anillos de aorta procedentes de las ratas albuminúricas (figura 24). Dado que el riñón es el principal órgano afectado en una situación de albuminuria, se estudió si el aumento del estrés oxidativo observado en la aorta se producía también en el riñón. Para ello se determinó en este tejido la actividad de la NADPH oxidasa como principal enzima generadora de EROs y la actividad total de la SOD como enzima antioxidante. Los resultados obtenidos mostraron un aumento en la actividad de NADPH oxidasa (figura 25a) y una disminución de la actividad de SOD (figura 25b) en las ratas MWF, lo cual se traduce en un aumento de estrés oxidativo a nivel renal.

Para comprobar si este aumento del estrés oxidativo en el riñón está relacionado exclusivamente con la presencia de albuminuria, se utilizaron ratas consómicas MWF-8^{SHR}. En esta cepa, la introducción del cromosoma 8 de una rata SHR en el fondo genético de las ratas MWF, produce la reversión de la albuminuria (tabla 10). Como se observa en este estudio, la reversión de la albuminuria se acompaña por una disminución de la actividad de NADPH oxidasa (figura 29a) y un aumento de la actividad de SOD (figura 29b) a nivel renal. Todo esto se traduce en una disminución del estrés oxidativo en las ratas consómicas. Estos resultados concuerdan con estudios previos realizados por Steireif y cols. (2012), en los que se mostró que la disfunción endotelial de este modelo animal está estrechamente asociada con la albuminuria, ya que en las ratas consómicas MWF-8^{SHR} se observa la reversión de la disfunción endotelial que muestran las ratas MWF.

Este aumento de estrés oxidativo en las ratas albuminúricas se observó también en los pacientes con albuminuria resistente al bloqueo del SRA, determinado mediante la concentración de carbonilos plasmáticos (figura 50) como marcador de daño oxidativo sobre proteínas. Por otro lado, en estos pacientes también se observó un daño vascular estudiado mediante la medida de la VOP entre la arteria carótida y la femoral. Los pacientes con albuminuria resistente mostraron un aumento de la VOP (figura 40a), observándose además una correlación positiva y significativa entre el grado de albuminuria de los pacientes y este valor (figura 40b). El valor medio de la VOP obtenido en los pacientes con albuminuria resistente fue de 9,45 m/s, considerándose 10 m/s el valor a partir del cual aparece rigidez arterial según la guía publicada por la Sociedad Europea de Hipertensión y la Sociedad Europea de Cardiología (ESH/ESC Guidelines, 2013). Estos resultados concuerdan con la literatura, en la

que estudios previos en los que se ha descrito que la albuminuria y una disminución en el aclaramiento renal están relacionados con un aumento de la VOP entre la carótida y la femoral (Mule y cols., 2010). En nuestro estudio, al igual que en publicaciones previas en las que se ha observado que la VOP aumenta al aumentar la edad, incluso en la población general (Georgianos y cols., 2015), el valor de VOP, correlacionó positivamente con la edad de los pacientes (figura 41).

El nexo de unión entre la rigidez arterial y la albuminuria no se conoce del todo, pero un posible mecanismo que puede relacionarlas es la disfunción endotelial. El remodelado de la pared arterial, a través de cambios estructurales y funcionales, que se producen en las propiedades del endotelio vascular, puede desembocar en la aparición de rigidez arterial. Estos factores pueden afectar también a los vasos glomerulares, y por consiguiente, modificar la permeabilidad de la BFG y permitir la excreción urinaria de albúmina (Kalaitzidis, y cols., 2015).

2. La albuminuria se asocia a un aumento en la actividad de MMP9

Se ha descrito previamente en otras patologías como cáncer, aterosclerosis, infarto de miocardio, ictus, etc. un aumento de la actividad tanto de MMP2 como de MMP9 (Sbardella y cols., 2012). Sin embargo, existen discrepancias en los estudios en pacientes sobre si las gelatinasas y sus inhibidores TIMPs aumentan de concentración y/o actividad en estados patológicos, o por el contrario, si disminuyen. Esto se puede deber al diseño del estudio, en cuanto a los criterios de inclusión, al grado de severidad de la patología que presentan los pacientes estudiados, a la presencia de comorbilidades, al uso de fármacos que afectan a las MMPs (Fontana y cols., 2012) o al sexo de los sujetos incluidos (Tayebjee y cols., 2005). Con respecto a la enfermedad renal, se ha descrito una correlación entre la actividad de MMP9 y la enfermedad renal diabética, encontrándose niveles elevados de esta proteasa en los estadios iniciales de la enfermedad renal crónica, incluso antes de que aparezca albuminuria (Altemtam y cols., 2012). Por otro lado, en el plasma de pacientes con diabetes tipo 1, que además presentan valores elevados de albúmina en orina, se ha observado un aumento de los niveles de MMP2 en comparación con aquellos que presentan normoalbuminuria (Peeters y cols., 2015).

Dadas estas evidencias se decidió estudiar el papel de MMP2 y de MMP9 en la albuminuria tanto en los pacientes como en el modelo animal de ratas MWF. Por motivos éticos no se pudo estudiar la actividad de MMP2 y MMP9 en el riñón de los pacientes con albuminuria resistente al bloqueo del SRA. Por consiguiente, el modelo animal de desarrollo espontáneo de

albuminuria, las ratas MWF, fue de gran utilidad. El estudio realizado en estas ratas, mostró un aumento de la actividad tanto de MMP2 como de MMP9 en plasma (figura 26a y 27 respectivamente) y en tejido renal (figura 26b y 28 respectivamente).

La determinación de la actividad de estas proteasas en el modelo animal se realizó por zimografía en gel de poliacrilamida. Con respecto a MMP2, mediante esta técnica sólo se pudo observar la actividad de la forma pro-MMP2, no observándose ninguna banda, ni en plasma ni en riñón, correspondiente al peso molecular de la forma activa de MMP2 (figura 26). Sin embargo, en la zimografía realizada en el riñón de las ratas para determinar la actividad gelatinasa de MMP9, se observaron 3 bandas, una correspondiente a la forma pro-MMP9, otra correspondiente a la forma glicosilada, y otra correspondiente a la forma activa (figura 28). El análisis de cada una de las bandas, mostró un aumento de la actividad de la MMP9 activa y de la forma glicosilada y una disminución de la actividad de pro-MMP9, en las ratas MWF. Este resultado sugiere que en condiciones de albuminuria, aumenta la activación de MMP9. En este sentido, en publicaciones anteriores se ha observado una mayor expresión de esta proteasa en enfermedades CV como hipertensión, aterosclerosis o infarto de miocardio (Vandooren y cols., 2013). Por otro lado, la banda correspondiente a la forma glicosilada no aparece en la zimografía realizada en las muestras de plasma de ratas (figura 27), esto se puede deber a que la glicosilación de las proteínas es un proceso post-traducciona, que ocurre en el interior celular y las muestras de plasma carecen de contenido celular (Vandooren J, y cols., 2013).

Para determinar si la actividad de MMP2 y MMP9 se asocia específica e independientemente con la albuminuria, se recurrió de nuevo al modelo experimental de ratas consómicas MWF-8^{SHR}. En este estudio se observó que la reversión de la albuminuria en las ratas MWF-8^{SHR} también se acompaña por una disminución de la actividad gelatinasa de MMP9 (figura 31). Este aumento de la actividad de la principal enzima encargada de la degradación de la MEC que forma parte de la BFG, puede ser un factor clave para el desarrollo y/o la progresión de la albuminuria en este modelo experimental.

Por otro lado, para analizar si la activación de las gelatinasas tenía relevancia clínica se estudió la activación de estas proteasas en el plasma de los pacientes con albuminuria resistente al bloqueo del SRA. Se observó un aumento de la actividad gelatinasa de MMP2 determinada mediante zimografía (figura 42b), que, sin embargo, no se reprodujo al determinar la concentración de MMP2 activa en el plasma de los pacientes mediante inmunoensayo (figura 43a). Probablemente esto se deba a que el aumento de la actividad de la MMP2 observado mediante la zimografía no corresponde a la forma activa de la MMP2 sino al zimógeno activado mediante las condiciones intrínsecas a esta técnica (Springman y cols.,

1990). Los resultados observados en plasma de pacientes concuerdan con los resultados obtenidos en las zimografías realizadas en el plasma y tejido renal de las ratas, en las cuales se observó sólo una banda de actividad cuyo peso molecular correspondió a 72 KDa, es decir a la pro-MMP2 (figura 26). La MMP2 se expresa de forma constitutiva en tejidos, y tiene una función principalmente de mantenimiento de la homeostasis tisular (Sbardella y cols., 2012), aunque algunos autores han observado un aumento de su actividad en respuesta a Ang II y citoquinas proinflamatorias (Chow y cols., 2007).

Con respecto al estudio de actividad de MMP9, se observó un aumento significativo de la actividad de esta proteasa en plasma de los pacientes con albuminuria resistente, en comparación con los normoalbuminúricos, tanto mediante la técnica de zimografía (figura 42c) como mediante el inmunoensayo (figura 43b). De esta manera, se confirmó en los pacientes con albuminuria resistente un aumento de la concentración de la MMP9 activa en plasma. A pesar de este aumento de la actividad de MMP9 observado, no se observaron diferencias en la concentración plasmática total de esta proteasa entre los diferentes grupos de pacientes (tabla 17). Este hecho sugiere que en la práctica clínica, la determinación de la concentración plasmática total de esta proteasa puede enmascarar su actividad real en condiciones patológicas como la albuminuria resistente al bloqueo del SRA. Por lo tanto, la determinación directa de la actividad de las MMPs es un resultado más fiable de la implicación de estas proteasas en una patología que la mera determinación de su concentración.

Enfermedades como la insuficiencia renal se asocian a un aumento de la rigidez arterial a través de varios mecanismos, como pueden ser la calcificación vascular, un aumento del volumen sanguíneo, la inflamación, la disfunción endotelial o el estrés oxidativo (Jia y cols., 2014). Sin embargo, se ha propuesto como posible nexo de unión entre la rigidez arterial y la albuminuria el aumento de la actividad de las MMPs a nivel sistémico, ya que estas proteasas son capaces de degradar la elastina y el colágeno que forma parte tanto de la MEC de los vasos sanguíneos, como de la MEC de la BFG (Zhang y cols., 2014). En este contexto, en el presente trabajo, el aumento de la actividad de MMP9 en plasma correlacionó de forma significativa y positiva con el grado de albuminuria que presentaron los pacientes (figura 45), con la VOP (figura 47). Esto sugiere que en los pacientes con albuminuria resistente, el aumento de VOP puede ser la consecuencia de un aumento de la actividad de las MMPs, ya que estas proteasas también pueden ejercer un efecto negativo sobre la estructura de la pared arterial. La MEC de la pared de los vasos sanguíneos está formada principalmente por elastina y colágeno (Richart y cols., 2007) que son los principales sustratos de la MMP9. Sin embargo, en el presente

estudio no se obtuvieron diferencias en la concentración plasmática de desmina (tabla 17), que es un metabolito de la degradación de la elastina.

3. El aumento de la actividad de MMP9 se debe a una disminución de la capacidad inhibitoria de TIMP1 producida por el aumento del estrés oxidativo

En el organismo, las MMPs se encuentran estrechamente reguladas por sus inhibidores, los TIMPs. En este estudio no se observaron diferencias en la expresión de TIMP1 (figura 44), principal inhibidor de MMP9, en los pacientes albuminúricos en comparación con los normoalbuminúricos, que expliquen el aumento en la actividad de MMP9. Dado que tampoco se observaron diferencias en la concentración plasmática total de MMP9 (tabla 17), este resultado concuerda con el hecho de que de la inhibición TIMP/MMP ocurre con una estequiometría 1: 1. Estudios previos han propuesto el aumento de estrés oxidativo como un activador de las MMPs (Rajagopalan y cols., 1996). Esto se debe a que el aumento de EROs puede producir una oxidación del TIMP que se traduce en una pérdida de la capacidad inhibitoria del mismo, que consecuentemente, produce un aumento en la actividad de la MMP (Wang y cols., 2007). En este contexto, en nuestro estudio se observó un aumento de la oxidación de las proteínas plasmáticas totales (figura 50), y más concretamente del inhibidor TIMP1 en el plasma de los pacientes con albuminuria resistente (figura 53).

Para comprobar si en los pacientes con albuminuria resistente, se observaba una disminución de la interacción entre TIMP1 y MMP9, que pudiese explicar el aumento de la actividad de esta gelatinasa, desarrollamos un novedoso ensayo utilizando la tecnología AlphaLISA, que permite determinar el grado de interacción entre dos proteínas. Esta técnica se ha validado previamente en la detección de otros marcadores de enfermedades CV como pueden ser los fragmentos N-terminales del péptido natriurético tipo pro-B circulantes en plasma, y se está estudiando su posible uso con perspectivas de evitar errores en el diagnóstico del fallo cardíaco (Foo y cols., 2013; Wan y cols., 2015). También se ha utilizado para determinar la interacción de otras parejas proteicas, como por ejemplo, en la infección por virus de hepatitis C, en la cual se ha estudiado la interacción entre las proteínas NS5A y CypA, necesaria para la replicación del virus (Waller y cols., 2010).

Para determinar la idoneidad de esta técnica en el estudio de la interacción de MMP9 y TIMP1 en el plasma de los pacientes, se validó previamente el ensayo utilizando proteínas recombinantes humanas. Los resultados mostraron que la interacción entre estas dos proteínas es detectable mediante el ensayo desarrollado (figura 54). Además, se obtuvo el

máximo de interacción cuando las dos proteínas se habían incubado a la misma concentración (3 µg/mL). Los resultados obtenidos tras analizar las muestras plasmáticas de los pacientes mostraron una disminución de la señal en los pacientes con albuminuria resistente en comparación con los normoalbuminúricos (figura 55). Dado que la señal obtenida es proporcional al número de parejas MMP9/TIMP1 que interaccionan en la muestra de plasma, esto se traduce en una disminución de la interacción de esta pareja proteica cuando la albuminuria está presente. Estos resultados sugieren que el aumento en la actividad de MMP9 en condiciones de albuminuria resistente, se debe a una disminución en la interacción de esta proteasa con su inhibidor producido probablemente por un aumento en la oxidación de TIMP1. En este sentido y como se ha dicho anteriormente, se observó en los pacientes estudiados que la actividad plasmática de MMP9 correlaciona de forma positiva con la concentración de carbonilos plasmáticos como marcador de daño oxidativo en proteínas (figura 51b).

4. Implicación del aumento de actividad de MMP9 sobre el desarrollo de albuminuria resistente al bloqueo del SRA

Se ha asociado un aumento de la actividad de MMP9 con un aumento del estrés oxidativo, inflamación (Marchesi y cols., 2012), hiperfiltración glomerular (Li y cols., 2014), daño podocitario (Nakamura y cols., 2000) y alteraciones en el remodelado de la MEC del glomérulo y el túbulo en estadios tempranos de insuficiencia renal diabética (Thraikill y cols., 2010; Altemtam y cols., 2012). Sin embargo, no se conocía la implicación de esta gelatinasa en el desarrollo de albuminuria que se produce pese a la supresión crónica del SRA. En este sentido en el presente trabajo se observó en pacientes con albuminuria resistente, un aumento de la degradación de colágeno tipo IV, que además correlacionó de forma significativa y positiva con la actividad de MMP9 (figura 48) de tal manera que a mayor actividad de MMP9, mayor degradación del colágeno tipo IV. Por otro lado, no se observó un aumento en la síntesis de colágeno (determinada a través de la concentración plasmática de PICP, que es un marcador de fibrosis) (tabla 17). En este sentido, el aumento de la degradación de este tipo de colágeno, que es uno de los componentes mayoritarios de la MEC, producirá como consecuencia la desestructuración de la misma, permitiendo probablemente el paso de la albúmina desde el plasma a la orina como se muestra en el esquema (figura 61), siendo un factor determinante en la instauración y/o la progresión de la albuminuria. Apoyando esta hipótesis, estudios previos en la literatura han demostrado en ratones con nefropatía diabética, que el

incremento en los niveles de MMP9 es previo a la instauración de la albuminuria en esta patología (Li y cols., 2014).

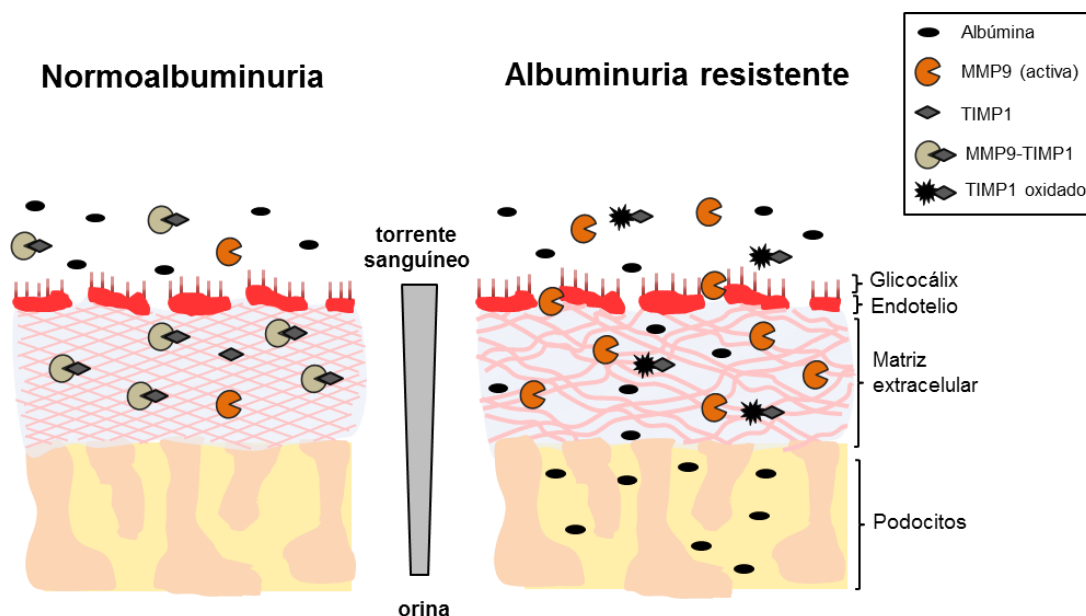


Figura 61. Modelo ilustrativo de propuesta sobre las consecuencias patológicas de una sobre activación de MMP9 en la barrera de filtración glomerular.

5. Las micropartículas como fuente de MMP9 y NOX5

Por otro lado, recientemente se ha comenzado a dar importancia al estudio y cuantificación de las micropartículas como marcadores de daño celular. Concretamente, se ha estudiado la formación de micropartículas por parte de las CE como respuesta a una situación de estrés, como puede ser el aumento del estrés oxidativo (Berezin y cols., 2015), y por parte de las células inflamatorias, en un proceso inflamatorio (George y cols., 2008). En el presente estudio, los resultados obtenidos en pacientes no mostraron diferencias significativas en el número de micropartículas totales determinadas en plasma (figura 56), ni en el número de micropartículas derivadas de CE ni de monocitos (figura 58 a y b respectivamente). Probablemente esto se deba a que el número de pacientes fue insuficiente para obtener diferencias significativas, ya que sí se observó una tendencia de aumento el número de micropartículas derivadas de CE y de monocitos en pacientes con albuminuria resistente. Aunque tampoco se puede descartar el efecto del tratamiento pautado sobre la formación de micropartículas, ya que se ha descrito que el tratamiento con estatinas, antiagregantes plaquetarios, antioxidantes, β -bloqueantes, ARA II o bloqueantes de canal de calcio reducen el número de micropartículas (George y cols., 2008; Georgescu y cols., 2012). Sin embargo, sí se observó una correlación positiva entre el número de micropartículas totales y la VOP en los

pacientes (figura 57), esto concuerda con estudios previos en los que se observó una asociación entre las micropartículas derivadas de CE y la VOP en pacientes con hipertensión moderada (Shantsila y cols., 2010).

Por otro lado, se ha descrito que las micropartículas, pueden contener distintas proteínas en su interior a través de las cuales juegan un papel activo en diferentes procesos fisiopatológicos (Berezin y cols., 2015). En este sentido observamos que las micropartículas extraídas de plasma de pacientes contenían pro-MMP9 (92 KDa) y MMP9 en su forma activa (82 KDa) (figura 59), lo cual coincide con otras publicaciones en las que se ha demostrado la expresión de esta metaloproteasa en las micropartículas derivadas de CE en patologías como el cáncer (Berezin y cols., 2015). También se observó la expresión de NOX5 (figura 60), que es una isoforma de la NADPH oxidasa con un importante papel en la patología renal (Holterman y cols., 2014). Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en el contenido de estas proteínas entre los pacientes normoalbuminúricos y los pacientes con albuminuria resistente. A pesar de ello, estos resultados sugieren que las micropartículas circulantes en plasma de los pacientes, son una fuente tanto de MMP9 como de NOX5.

6. Efecto del tratamiento farmacológico sobre los marcadores estudiados

El aumento de la actividad de MMP9 y del estrés oxidativo observado en los pacientes con albuminuria resistente al bloqueo del SRA difiere de numerosas publicaciones en la literatura en las que se afirma que los fármacos bloqueantes del SRA son además inhibidores de la actividad de MMP9 (Jin y cols., 2007; Cheng y cols., 2011). En los pacientes estudiados en este trabajo no se observaron diferencias en la actividad de la MMP9 en función del tipo de tratamiento pautado (figura 49), a pesar de que hay algunos estudios en los que se propone que el efecto antiproteinúrico de los iECA es más efectivo que el de los ARAII (Lods y cols., 2003). Concretamente, se ha propuesto como mecanismo de acción común para su inhibición la analogía entre la ECA y las MMPs, ya que las dos son endopeptidasas dependientes de Zn^{2+} (Jin y cols., 2007; Cheng y col., 2011). Algunos estudios proponen que el efecto antiproteinúrico de los bloqueantes del SRA ocurre a dosis superiores de las utilizadas para el tratamiento de la hipertensión en patologías como la diabetes mellitus tipo 2 (Hollenberg y cols., 2007). Esto puede sugerir que en estos pacientes el bloqueo de SRA no es completo, sin embargo, la determinación de la concentración plasmática de renina y de aldosterona, no mostró diferencias significativas entre los grupos de pacientes (tabla 15). A pesar de ello, no se puede descartar que la concentración plasmática obtenida no sea mayor en los pacientes del presente estudio en comparación con los valores que presenta la población sana.

Por otro lado, son también numerosas las publicaciones en las que se observa que un tratamiento con estatinas es capaz de disminuir la excreción urinaria de albúmina y la progresión de la enfermedad renal, lo cual se ha relacionado en parte con su capacidad para disminuir el estrés oxidativo y con su efecto inhibitor tanto de la actividad como la síntesis de MMPs, entre ellas MMP2 y MMP9 (Strippoli y cols., 2008; Abe y cols., 2011; Tsubaki y cols., 2015; Roth y cols., 2016). Incluso se ha propuesto que la combinación los bloqueantes del SRA y las estatinas tiene un gran potencial no solo impidiendo la progresión de la enfermedad crónica renal, sino también inhibiendo el desarrollo de enfermedad CV (Satoh, 2012). En nuestro estudio, más del 70% de los pacientes tanto con normoalbuminuria como con albuminuria resistente se encontraban en tratamiento hipolipemiante con estatinas, llegando al 88% en los pacientes con albuminuria resistente severa (tabla 16). Este resultado indica que el tratamiento con estatinas no impide la activación de MMP9 en patologías como la albuminuria resistente al bloqueo del SRA, ya que son los pacientes con albuminuria resistente severa los que están tratados en mayor porcentaje con estatinas y los que presentan una mayor concentración de MMP9 activa (figura 43b).

Nuestro estudio al igual que otros, muestra que las terapias actuales utilizadas para disminuir la albuminuria no son capaces de bloquear completamente la progresión de la enfermedad renal, lo cual sugiere que se necesitan nuevas estrategias terapéuticas (Molina y cols., 2014). En este contexto se ha descrito que otros fármacos que se utilizan en el tratamiento de la hipertensión como son los antagonistas de aldosterona, como por ejemplo espironolactona y eplerenona, disminuyen la albuminuria de un 30-60% y la progresión de la enfermedad crónica renal tanto en modelos experimentales como en estudios clínicos de nefropatía diabética (Rojas-Rivera y cols., 2012). Además, son capaces de atenuar el aumento de la actividad de MMP2 y MMP9 inducido por aldosterona (Rude y cols., 2005). Por lo tanto, un tratamiento con antagonistas de aldosterona sería una estrategia terapéutica a seguir en los pacientes que desarrollan albuminuria resistente al bloqueo del SRA. Por otro lado, nebivolol (β 1-bloqueante) presenta efectos antioxidantes asociados a una disminución de MMP9 y MMP2 a nivel vascular (Ceron y cols., 2013).

Debido a la participación de las MMPs en diversos procesos patológicos, su inhibición sugiere un gran potencial terapéutico, a pesar de ello, los ensayos clínicos realizados hasta la fecha han fallado (Fields y cols., 2015; Wang y cols., 2012; Coussens y cols., 2002; Peterson y cols., 2001). Esto se puede deber a la poca selectividad de los inhibidores, junto con una pobre validación del tratamiento para la terapia estudiada o a que los resultados preclínicos en modelos animales sobre la seguridad y eficacia de los fármacos han sido insuficientes

(Mannello y Medda, 2012). El único tratamiento aprobado por la FDA con inhibidores de MMPs es el uso de doxiciclina a dosis subantimicrobianas para el tratamiento de enfermedades periodontales. Sin embargo, el estudio MIDAS (*Metalloproteinase Inhibition with subantimicrobial dose Doxycycline to prevent acute coronary Syndromes*), es un estudio prospectivo randomizado, en el que se evaluó la capacidad de la doxiciclina a dosis subantimicrobianas para disminuir la inflamación e inhibir a las MMPs en un grupo de pacientes con enfermedad sintomática de arterias coronarias. En este estudio se observó que un tratamiento de seis meses con doxiciclina estaba asociado a una disminución estadísticamente significativa del 46% en los niveles de hs-CRP (high sensitivity-C reactive protein), del 54% de la actividad de MMP9 y del 32% de los niveles de IL-6 (Brown y cols., 2004).

Por otro lado y dada la poca selectividad de los inhibidores sintéticos, recientemente se ha desarrollado un hidrogel con estructura polisacáridica, en el que se encuentra retenido el inhibidor TIMP recombinante. Este hidrogel se puede inyectar en el tejido dañado por un aumento de la actividad de las MMPs, liberando el TIMP recombinante de forma dependiente a la actividad de la MMP (Purcell y cols., 2014). De esta manera, al inhibir a la MMP en función de su actividad, evita la aparición de efectos adversos relacionados con una inhibición excesiva como ocurre con las tetraciclinas.

7. Tratamiento antioxidante como estrategia terapéutica

Se ha descrito que un tratamiento antioxidante presenta un gran potencial terapéutico en la enfermedad CV y renal. En modelos animales de hipertensión (Hong y cols., 2001) y nefropatía diabética (Sedeek y cols., 2013) entre otros, se han observado grandes beneficios de un tratamiento antioxidante. Sin embargo, los ensayos clínicos realizados en pacientes con enfermedad CV y renal no confirman este efecto beneficioso (Cook y cols., 2007; Himmelfarb y cols., 2014). Las posibles razones por las cuales han fallado los estudios clínicos son varias. Una causa probable es que el tipo de agente antioxidante usado no fuera suficientemente efectivo o específico, al igual que la dosis, la duración de la terapia o la vía de administración puede que no fuesen las adecuadas en estos estudios. Por ejemplo, una administración oral puede hacer que el antioxidante no llegue a la fuente de EROs, sobre todo si éstas se generan a nivel intracelular, como es el caso por ejemplo, de la vitamina C que es una vitamina hidrosoluble incapaz de cruzar las membranas lipídicas (Montezano y cols., 2015). Otra razón a tener en cuenta es que los antioxidantes no inhiben la producción de EROs, ni revierten el daño que

causan, sino que su principal mecanismo de acción es la captación de las EROs una vez formadas (Paravinci y Touyz, 2008; Montezano y cols., 2015).

Por otro lado, con respecto a las cohortes incluidas en los estudios, la mayoría de los individuos presentaban enfermedades CV ya establecidas, en las cuales los efectos de los oxidantes son irreversibles (Paravinci y Touyz, 2008; Montezano y cols., 2015). A este respecto, otro factor a tener en cuenta es que a los pacientes no se les realizó una determinación de su estatus oxidativo antes de realizar el estudio para demostrar que tenían aumentado el estado oxidativo (Montezano y cols., 2015). De hecho, no se ha diseñado ningún ensayo clínico en el que el reclutamiento de los pacientes se haya basado en un aumento de la formación de EROs o en un aumento del daño oxidativo (Paravinci y Touyz, 2008).

Los agentes que actúan disminuyendo la formación de EROs, en lugar de actuar neutralizándolos una vez formados, presentan un mayor potencial terapéutico, ya que existen evidencias en modelos experimentales en los cuales la inhibición de la NADPH oxidasa y por lo tanto la inhibición de la síntesis de $O_2^{\cdot-}$, disminuye el remodelado vascular, mejora la función endotelial y disminuye la presión sanguínea (Paravinci y Touyz, 2008). En este contexto, existen numerosos estudios en la literatura que confirman los efectos beneficiosos de un tratamiento con vitamina D en pacientes con enfermedad renal.

Actualmente, la *National Kidney Foundation-Kidney Disease Outcomes Quality Initiative* (NKF-KDOQI) y la *Kidney Disease Improving Global Outcomes* (KDIGO) recomiendan en las guías de buena práctica clínica la suplementación con vitamina D a pacientes con hiperparatiroidismo secundario y enfermedades asociadas con la homeostasis mineral y enfermedades óseas. Incluso se recomienda que los niveles de vitamina D en pacientes con insuficiencia renal deben ser lo más altos posibles debido a la pérdida que sufren de 25-hidroxicolecalciferol asociada a la pérdida de la DBP a través de la orina (Jones, 2007).

La disminución de la concentración plasmática de la vitamina D es una característica común entre los pacientes con enfermedad renal. Este hecho concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio tanto en pacientes con albuminuria resistente (tabla 15), como en ratas MWF (tabla 8). En los pacientes con albuminuria resistente se observa una disminución significativa de la concentración de 25-hidroxicolecalciferol en plasma que se sitúa en el rango de deficiencia (<20ng/mL). Por otro lado, las ratas consómicas MWF-8^{SHR}, que presentan una reversión de la albuminuria (tabla 10) acompañada por una disminución de enzimas prooxidantes y un aumento de las antioxidantes (figura 29 a y b respectivamente), junto con una disminución de la activación de la MMP9, también mostraron un aumento de la

concentración plasmática de 25-hidroxicolecalciferol hasta llegar a valores similares a los que presentaron las ratas controles (tabla 10). Por otro lado, en el plasma de los pacientes se observó una correlación negativa y significativa entre la concentración de carbonilos plasmáticos como marcador de estrés oxidativo y la concentración de 25-hidroxicolecalciferol (figura 51a).

La vitamina D es capaz de disminuir la síntesis de renina (Pilz y cols., 2009) y por lo tanto evitar el aumento de estrés oxidativo asociado con la activación del receptor AT1 de Ang II, además de disminuir la albuminuria (Bhat e Ismail, 2015). Inclusive, se ha propuesto la suplementación con vitamina D como coadyuvante en el tratamiento de la nefropatía diabética con bloqueantes de SRA, ya que se ha demostrado que la combinación de estos dos tratamientos es más efectiva que el tratamiento individual (Zhang* y cols., 2008). Además, se ha demostrado que mejora la función renal y disminuye el daño mitocondrial de forma más efectiva que el tratamiento realizado con cada uno de los dos fármacos de forma individual (Finch y cols., 2012; García y cols., 2014).

En cuanto a los efectos de la vitamina D sobre la rigidez arterial, a pesar de que existen evidencias sobre la disminución de infiltración de células inflamatorias y un aumento en la biodisponibilidad de NO tras el tratamiento con vitamina D, los resultados son contradictorios. Existen estudios en los que el tratamiento con vitamina D no muestra una disminución en la rigidez, pese a observarse efectos beneficiosos sobre la función endotelial (Chitalia y cols., 2014; Stricker y cols., 2012; Gepner y cols., 2012). En este contexto, Salum y cols. (2012) no observaron una disminución de la rigidez arterial en ratas diabéticas al tratarlas con vitamina D, aunque sí observaron que la vitamina D preservaba la estructura de las fibras de elastina y la proporción elastina/colágeno en la pared de la aorta. Sin embargo, hay otros estudios que afirman que el tratamiento con esta vitamina disminuye la progresión de rigidez arterial (Dong y cols., 2010; Breslavsky y cols., 2013).

8. El tratamiento con calcitriol mejora la función vascular y corrige el aumento de actividad de MMP9

Con todas estas evidencias en la literatura, otro de los objetivos que se planteó en la presente tesis doctoral fue realizar un tratamiento con calcitriol a las ratas MWF, para determinar los efectos beneficiosos que este tratamiento pudiera tener sobre la albuminuria y los demás factores negativos asociados a ella, como son la disfunción endotelial, el estrés oxidativo y la activación de la MMP9. En este estudio el tratamiento con calcitriol se comenzó

en la semana 6 ya que es la edad a partir de la cual las ratas MWF desarrollan albuminuria (van Es y cols., 2006). Por otro lado, la elección del metabolito activo para llevar a cabo el tratamiento se debió a que se ha descrito que a medida que avanza la insuficiencia renal, los niveles de CYP27B1 (enzima clave en el proceso de activación de la vitamina D) decaen, por lo tanto, el tratamiento con 25-hidroxicolecalciferol puede no ser suficiente para generar los niveles necesarios de calcitriol (Jones, 2007).

Los resultados obtenidos en los estudios de función vascular en aorta, mostraron un aumento significativo en la respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio en los animales albuminúricos tras el tratamiento con calcitriol (figura 34). Éste, además, se acompañó de un aumento de la biodisponibilidad de NO (tabla 13) y una disminución de la acción de prostanoïdes vasoconstrictores (figura 37). Estos resultados concuerdan con publicaciones previas en la literatura, en las cuales se observó que el tratamiento con paricalcitol (análogo del calcitriol) sólo o en combinación con enalapril, en un modelo animal de aterosclerosis, disminuyó la inflamación y el estrés oxidativo, disminuyendo la expresión de enzimas pro-oxidantes como COX2, óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) o NADPH oxidasa y aumentando la expresión de proteínas antioxidantes como GSH, SOD o eNOS (Husain y cols., 2010).

Por otro lado, en el presente estudio se observó que el tratamiento realizado fue capaz de disminuir la actividad de MMP9, tanto en riñón como en plasma, en las ratas albuminúricas (figura 38). Este resultado se apoya en estudios previos realizados en células, en modelos animales y en pacientes como se indica a continuación. Estudios realizados in vitro indican que el tratamiento con 1,25-dihidroxicolecalciferol disminuye la producción de MMPs en varios tipos celulares (Chen y cols., 2015; Miyashita y cols., 2016). Por otro lado, en ratones knockout para VDR se ha observado una disminución de la expresión de los TIMPs y un aumento de la actividad de MMP2 y MMP9 (Rahman y cols., 2007). Incluso se ha observado un aumento de la expresión de MMP9 circulante en la población que presenta un déficit de vitamina D. Este aumento se corrige con un tratamiento con vitamina D, aunque los niveles de vitamina D en plasma aumenten modestamente (Timms y cols., 2002).

A pesar de estos resultados, no se observaron modificaciones en la concentración de 25-hidroxicolecalciferol, ni en las ratas controles, ni en las ratas albuminúricas tras el tratamiento (tabla 12). Esto puede deberse a que el tratamiento realizado se llevó a cabo con 1,25-dihidroxicolecalciferol y no con 25-hidroxicolecalciferol. En este sentido, se ha descrito que el metabolito activo de la vitamina D tiene una vida media en plasma de 4 horas (Holick y cols., 2004) habiéndose realizado la última administración de calcitriol 24 horas antes del sacrificio del animal y la recogida del plasma donde se analizó su concentración.

Una limitación de este trabajo es que no se pudieron obtener los valores de albuminuria tras el tratamiento, para poder determinar si los cambios beneficiosos observados tras el mismo están relacionados con una disminución de la excreción urinaria de albúmina. O por el contrario, determinar si el tratamiento no fue suficiente para producir la reversión de la albuminuria, a pesar de la disminución de la actividad de MMP9 a nivel renal y la mejora de la función vascular observada.

Estudios previos realizados en pacientes hipertensos controlados que desarrollan albuminuria resistente al bloqueo del SRA, muestran que estos pacientes presentan un aumento en la capacidad antioxidante, que sin embargo, no llega a ser suficiente para contrarrestar el aumento de estrés oxidativo (Ruiz-Hurtado y cols., 2014). Por esta razón un tratamiento antioxidante podría contribuir a incrementar su capacidad antioxidante total y por lo tanto, contrarrestar el aumento del estrés oxidativo, lo cual además, podría tener efectos beneficiosos sobre la albuminuria. Apoyando esta hipótesis, existen evidencias en la literatura que demuestran que en pacientes con insuficiencia renal crónica que se hallaban bajo bloqueo del RAAS, el tratamiento con paricalcitol disminuyó la proteinuria significativamente (de Lorenzo y cols., 2013).

A pesar de los numerosos estudios en animales, como el realizado en el presente trabajo, han mostrado los beneficios del tratamiento con vitamina D (Takenaka y cols., 2014; Zhang* y cols., 2014), así como estudios observacionales en pacientes que han mostrado una disminución del riesgo de mortalidad en pacientes con enfermedad renal crónica (Seker y cols., 2013; de Medeiros Cavalcante y cols., 2015), los ensayos clínicos no establecen evidencias firmes sobre los beneficios de la suplementación con vitamina D (Rojas-Rivera y cols., 2010; Bosworth y de Boer 2013). Esta controversia puede deberse al diseño de los ensayos clínicos, en los que una dosificación más precisa, la elección del agente terapéutico, la duración del ensayo, los parámetros a monitorizar y las indicaciones de la terapia con vitamina D, deberían tener un acotamiento más preciso (Rojas-Rivera y cols., 2010). Uno de los posibles motivos por los cuales los ensayos clínicos con vitamina D no han tenido éxito puede ser que el calcitriol aumenta los niveles de FGF23, factor que a su vez activa los mecanismos de degradación de esta vitamina (Tuñón y cols., 2014; Bosworth y de Boer, 2013). Por otro lado, la vitamina D es una vitamina liposoluble cuyo exceso se almacena en el tejido graso del organismo, por lo que la toma en exceso de vitamina D puede causar toxicidad a dosis muy altas (Lee y cols., 2008) pudiendo ocasionar diversos problemas, sobre todo si se acompaña de un suplemento de calcio, tales como piedras renales, empeoramiento de la función renal y efectos CV negativos (Norman y Powell, 2014). En este sentido, una alternativa terapéutica interesante sería hacer

uso de análogos de vitamina D de tercera generación que tienen menos efecto calcémico y fosfatémico que el calcitriol, como por ejemplo el paricalcitol (cuya estructura química es 19-nor-1,25-dihidroxitamina D2) (Duplancic y cols., 2013). No obstante, en nuestro estudio, a pesar del uso de calcitriol, no se observaron alteraciones en el calcio ni en el fósforo plasmático en las ratas tratadas con el mismo (tabla 12).

9. Conclusiones

En conclusión, este es el primer estudio que demuestra, a través del uso de modelos experimentales y de pacientes, que la activación de MMP9 es exclusivamente dependiente de la presencia de albuminuria y no de otras comorbilidades. En este sentido, se comprobó una asociación entre la activación de esta proteasa y la albuminuria desarrollada bajo el bloqueo del SRA, a pesar del buen control lipídico y de presión arterial que muestran los pacientes. El aumento de la actividad de esta proteasa está asociado a otros marcadores negativos como el aumento de la VOP, factor determinante de rigidez arterial. El mecanismo por el cual se observa un aumento en la actividad de esta proteasa es independiente de su expresión, se debe a un aumento en la oxidación de su inhibidor, TIMP1, lo cual produce una disminución de la interacción TIMP1/MMP9, que desencadena el aumento de la actividad de MMP9. Todos estos resultados muestran que un buen bloqueo del SRA, no garantiza el control de la actividad de MMP9 en los pacientes que se encuentran en un estadio temprano de enfermedad crónica renal. Este aumento de la actividad de MMP9 puede producir un aumento de la degradación de colágeno tipo IV, que es el principal componente de la MEC que forma parte de la BFG, lo cual se puede traducir en una pérdida de la estructura de la misma, que favorecería el paso de la albúmina desde el torrente sanguíneo a la orina, y por lo tanto, la aparición de albuminuria como se ha propuesto en la figura 61. En este sentido, en el presente estudio se ha observado el efecto beneficioso de una suplementación con calcitriol sobre la función vascular, al igual que una disminución de la actividad de MMP9 tras este tratamiento. En este contexto, el uso de una terapia coadyuvante como la suplementación con vitamina D, podría mejorar los daños asociados a la albuminuria resistente.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La albuminuria está relacionada con un aumento del estrés oxidativo y disfunción endotelial.
2. La albuminuria se asocia con un aumento de la actividad de MMP9 en plasma y en riñón, por lo que la determinación de este parámetro en plasma podría reflejar daño renal.
3. La determinación de la actividad de MMP9 es un marcador plasmático de mayor relevancia en la práctica clínica que la determinación de su concentración, ya que un aumento en la actividad de MMP9 no siempre se corresponde con variaciones en la concentración de esta gelatinasa.
4. El aumento del estrés oxidativo asociado a la albuminuria favorece la oxidación de TIMP1, con la consiguiente pérdida de su capacidad de interacción con MMP9. Esta disminución en la interacción MMP9/TIMP1 podría ser la causa del aumento de la actividad de esta gelatinasa.
5. El ensayo de interacción entre MMP9 y TIMP1 desarrollado a partir de la tecnología AlphaLISA, tiene un gran potencial como método de estudio de la interacción de esta proteasa con su inhibidor en la investigación clínica.
6. El aumento del estrés oxidativo asociado a la albuminuria es un factor común para la disfunción endotelial y el aumento de la actividad de MMP9, pudiendo afectar mediante ambos mecanismos a la estructura de la barrera de filtración glomerular y por lo tanto contribuir a la instauración y/o progresión de la albuminuria.
7. La disminución de la concentración plasmática de 25-hidroxicolecalciferol se asocia a la presencia de albuminuria. La normalización de sus niveles puede ser una estrategia terapéutica beneficiosa para prevenir la instauración y/o progresión de la albuminuria resistente al bloqueo del SRA.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

1. Albuminuria is associated with an increase in oxidative stress and with endothelial dysfunction.
2. Albuminuria is related to an increase in MMP9 activity in both plasma and kidney. Therefore the determination of plasma MMP9 activity could reflect kidney damage.
3. Active MMP9 determination presents higher relevance in the clinical practice than its concentration determination, since an increased MMP9 activity does not always correspond with variations in the total concentration of this gelatinase.
4. The increase in oxidative stress associated with albuminuria leads to TIMP1 oxidation and to the loss of its inhibitory ability. This decrease in MMP9/TIMP1 interaction could be the reason for the increased MMP9 activity.
5. MMP9/TIMP1 interaction assay developed using AlphaLISA technology has a high potential in clinical research.
6. The increase in oxidative stress associated with albuminuria is a common factor for both the development of endothelial dysfunction and the increase in MMP9 activity. Both mechanisms could have a negative effect on the glomerular filtration barrier structure, and contribute to the onset and/or progression of albuminuria.
7. The decrease in 25-hydroxycolecalciferol plasma concentration is associated with albuminuria. The elevation of its levels could be a potential therapeutic strategy to prevent the onset and/or progression of resistant albuminuria.

BIBLIOGRAFÍA

- **Abdelhafiz AH, Ahmed S, El Nahas M.** Microalbuminuria: marker or maker of cardiovascular disease. *Nephron Exp Nephrol.* 2011;119(1):6-10.
- **Abe M, Maruyama N, Okada K, Matsumoto S, Matsumoto K, Soma M.** Effects of lipid-lowering therapy with rosuvastatin on kidney function and oxidative stress in patients with diabetic nephropathy. *J Atheroscler Thromb.* 2011;18(11):1018-28.
- **Abrahamson DR.** Role of the podocyte (and glomerular endothelium) in building the GBM. *Semin Nephrol.* 2012;32(4):342-9.
- **Agarwal R, Acharya M, Tian J, Hippensteel RL, Melnick JZ, Qiu P, Williams L, Battle D.** Antiproteinuric effect of oral paricalcitol in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2005;68(6):2823-8.
- **Al Mheid I, Patel R, Murrow J, Morris A, Rahman A, Fike L, Kavtaradze N, Uphoff I, Hooper C, Tangpricha V, Alexander RW, Brigham K, Quyyumi AA.** Vitamin D status is associated with arterial stiffness and vascular dysfunction in healthy humans. *J Am Coll Cardiol.* 2011;58(2):186-92.
- **Alborzi P, Patel NA, Peterson C, Bills JE, Bekele DM, Bunaye Z, Light RP, Agarwal R.** Paricalcitol reduces albuminuria and inflammation in chronic kidney disease: a randomized double-blind pilot trial. *Hypertension.* 2008;52(2):249-55.
- **Alleva R, Tomasetti M, Battino M, Curatola G, Littarru GP, Folkers K.** The roles of coenzyme Q10 and vitamin E on the peroxidation of human low density lipoproteina subfractions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:9388-9391.
- **Altemtam N, Nahas ME, Johnson T.** Urinary matrix metalloproteinase activity in diabetic kidney disease: a potential marker of disease progression. *Nephron Extra.* 2012;2:219-32.
- **Amer M, Qayyum R.** Relation between serum 25-hydroxyvitamin D and C-reactive protein in asymptomatic adults (from the continuous National Health and Nutrition Examination Survey 2001 to 2006). *Am J Cardiol.* 2012;109(2):226-30.
- **Anderson HC, Mulhall D, Garimella R.** Role of extracellular membrane vesicles in the pathogenesis of various diseases, including cancer, renal diseases, atherosclerosis, and arthritis. *Lab Invest.* 2010;90(11):1549-57.
- **Andrukhova O, Slavic S, Zeitz U, Riesen SC, Heppelmann MS, Ambrisko TD, Markovic M, Kuebler WM, Erben RG.** Vitamin D is a regulator of endothelial nitric oxide synthase and arterial stiffness in mice. *Mol Endocrinol.* 2014;28(1):53-64.
- **Arpino V, Brock M, Gill SE.** The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. *Matrix Biol.* 2015;44-46:247-54.
- **Asselbergs FW1, Diercks GF, Hillege HL, van Boven AJ, Janssen WM, Voors AA, de Zeeuw D, de Jong PE, van Veldhuisen DJ, van Gilst WH; Prevention of Renal and Vascular Endstage Disease Intervention Trial (PREVEND IT) Investigators.** Effects of fosinopril and pravastatin on cardiovascular events in subjects with microalbuminuria. *Circulation.* 2004;110(18):2809-16.
- **Atkinson J, Epand RF, Epand RM.** Tocopherols and tocotrienols in membranes: a critical review. *Free Radic Biol Med.* 2008;44:739-764.

- **Avolio A, Jones D, Tafazzoli-Shadpour M.** Quantification of alterations in structure and function of elastin in the arterial media. *Hypertension*. 1998;32(1):170-5.
- **Bacchetta J, Sea JL, Chun RF, Lisse TS, Wesseling-Perry K, Gales B, Adams JS, Salusky IB, Hewison M.** Fibroblast growth factor 23 inhibits extrarenal synthesis of 1,25-dihydroxyvitamin D in human monocytes. *J Bone Miner Res*. 2013;28(1):46-55.
- **Bakris GL, Ruilope L, Locatelli F, Ptaszynska A, Pieske B, de Champlain J, Weber MA, Raz I.** Treatment of microalbuminuria in hypertensive subjects with elevated cardiovascular risk: results of the IMPROVE trial. *Kidney Int*. 2007;72(7):879-85.
- **Baricos WH, Cortez SL, el-Dahr SS, Schnaper HW.** ECM degradation by cultured human mesangial cells is mediated by a PA/plasmin/MMP-2 cascade. *Kidney Int*. 1995;47(4):1039-47.
- **Barrera-Ramírez LM, Drago-Serrano ME, Pérez-Ramos J, Zamora AC, Gómez-Arroyo F, Saíñz-Espuñes TR, Mendoza-Pérez F.** Citometría de flujo: Vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Rev Inst Nac Enf Resp*. 2004;17(1):42-55
- **Basalyga DM, Simionescu DT, Xiong W, Baxter BT, Starcher BC, Vyavahare NR.** Elastin degradation and calcification in an abdominal aorta injury model: role of matrix metalloproteinases. *Circulation*. 2004;110(22):3480-7.
- **Baynes JW.** Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*. 1991;40(4):405-12.
- **Beaudet L, Rodríguez-Suarez R, Venne MH, Caron M, Bédard J, Brechler V, Parent S & Bielefeld-Sévigny M.** AlphaLISA immunoassays: the no-wash alternative to ELISAs for research and drug Discovery. *Nature Methods*. 2008;5(12): an8–an9
- **Benigni A, Morigi M, Rizzo P, Gagliardini E, Rota C, Abbate M, Ghezzi S, Remuzzi A, Remuzzi G.** Inhibiting angiotensin-converting enzyme promotes renal repair by limiting progenitor cell proliferation and restoring the glomerular architecture. *Am J Pathol*. 2011;179(2):628-38.
- **Bensasson R, Land EJ, Maudinas B.** Triplet states of carotenoids from photosynthetic bacteria studied by nanosecond ultraviolet and electron pulse irradiation. *Photochem Photobiol*. 1976;23:189-193.
- **Berezin A, Zulli A, Kerrigan S, Petrovic D, Kruzliak P.** Predictive role of circulating endothelial-derived microparticles in cardiovascular diseases. *Clin Biochem*. 2015 Jun;48(9):562-8
- **Bhat M, Ismail A.** Vitamin D treatment protects against and reverses oxidative stress induced muscle proteolysis. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2015;152:171-9.
- **Bonnans C, Chou J, Werb Z.** Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(12):786-801.
- **Bonomini F, Tengattini S, Fabiano A, Bianchi R, Rezzani R.** Atherosclerosis and oxidative stress. *Histol Histopathol*. 2008;23:381-390.
- **Bosworth C, de Boer IH.** Impaired vitamin D metabolism in CKD. *Semin Nephrol*. 2013 Mar;33(2):158-68.

- **Brenner BM, Cooper ME, de Zeeuw D, Keane WF, Mitch WE, Parving HH, Remuzzi G, Snapinn SM, Zhang Z, Shahinfar S; RENAAL Study Investigators.** Effects of losartan on renal and cardiovascular outcomes in patients with type 2 diabetes and nephropathy. *N Engl J Med.* 2001;345(12):861-9.
- **Brenner BM, Hostetter TH, Humes HD.** Molecular basis of proteinuria of glomerular origin. *N Engl J Med.* 1978;298(15):826-33.
- **Breslavsky A, Frand J, Matas Z, Boaz M, Barnea Z, Shargorodsky M.** Effect of high doses of vitamin D on arterial properties, adiponectin, leptin and glucose homeostasis in type 2 diabetic patients. *Clin Nutr.* 2013;32(6):970-5.
- **Brown DL, Desai KK, Vakili BA, Nouneh C, Lee HM, Golub LM.** Clinical and biochemical results of the metalloproteinase inhibition with subantimicrobial doses of doxycycline to prevent acute coronary syndromes (MIDAS) pilot trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24(4):733-8.
- **Burgaz A, Orsini N, Larsson SC, Wolk A.** Blood 25-hydroxyvitamin D concentration and hypertension: a meta-analysis. *J Hypertens.* 2011;29(4):636-45.
- **Burger D, Touyz RM.** Cellular biomarkers of endothelial health: microparticles, endothelial progenitor cells, and circulating endothelial cells. *J Am Soc Hypertens.* 2012;6(2):85-99.
- **Burger D, Thibodeau JF, Holterman CE, Burns KD, Touyz RM, Kennedy CR.** Urinary podocyte microparticles identify prealbuminuric diabetic glomerular injury. *J Am Soc Nephrol.* 2014 Jul;25(7):1401-7
- **Castro MM, Rizzi E, Ceron CS, Guimaraes DA, Rodrigues GJ, Bendhack LM, Gerlach RF, Tanus-Santos JE.** Doxycycline ameliorates 2K-1C hypertension-induced vascular dysfunction in rats by attenuating oxidative stress and improving nitric oxide bioavailability. *Nitric Oxide.* 2012;26(3):162-8.
- **Castro MM, Tanus-Santos JE.** Inhibition of matrix metalloproteinases (MMPs) as a potential strategy to ameliorate hypertension-induced cardiovascular alterations. *Curr Drug Targets.* 2013;14(3):335-43.
- **Caterina JJ, Yamada S, Caterina NC, Longenecker G, Holmbäck K, Shi J, Yermovsky AE, Engler JA, Birkedal-Hansen H.** Inactivating mutation of the mouse tissue inhibitor of metalloproteinases-2(Timp-2) gene alters proMMP-2 activation. *J Biol Chem.* 2000;275(34):26416-22.
- **Cecelja M, Chowieńczyk P.** Role of arterial stiffness in cardiovascular disease. *JRSM Cardiovasc Dis.* 2012;1(4).
- **Cerasola G, Cottone S, Mulè G.** The progressive pathway of microalbuminuria: from early marker of renal damage to strong cardiovascular risk predictor. *J Hypertens.* 2010;28(12):2357-69.
- **Cerezo C, Ruilope LM, Segura J, Garcia-Donaire JA, de la Cruz JJ, Banegas JR, Waeber B, Rabelink TJ, Messerli FH.** Microalbuminuria breakthrough under chronic renin-angiotensin-aldosterone system suppression. *J Hypertens.* 2012;30(1):204-9.
- **Ceron CS, Rizzi E, Guimaraes DA, Martins-Oliveira A, Cau SB, Ramos J, Gerlach RF, Tanus-Santos JE.** Time course involvement of matrix metalloproteinases in the vascular alterations of renovascular hypertension. *Matrix Biol.* 2012;31(4):261-70.

- **Ceron CS, Rizzi E, Guimarães DA, Martins-Oliveira A, Gerlach RF, Tanus-Santos JE.** Nebivolol attenuates prooxidant and profibrotic mechanisms involving TGF- β and MMPs, and decreases vascular remodeling in renovascular hypertension. *Free Radic Biol Med.* 2013;65:47-56.
- **Chade AR.** Renal vascular structure and rarefaction. *Compr Physiol.* 2013;3(2):817-31.
- **Chang FC, Lai TS, Chiang CK, Chen YM, Wu MS, Chu TS, Wu KD, Lin SL.** Angiotensin-2 is associated with albuminuria and microinflammation in chronic kidney disease. *PLoS One.* 2013;8(3):e54668.
- **Chase AJ, Newby AC.** Regulation of matrix metalloproteinase (matrixin) genes in blood vessels: a multi-step recruitment model for pathological remodelling. *J Vasc Res.* 2003;40(4):329-43.
- **Chen F, Yu Y, Haigh S, Johnson J, Lucas R, Stepp DW, Fulton DJ.** Regulation of NADPH oxidase 5 by protein kinase C isoforms. *PLoS One.* 2014 Feb 5;9(2):e88405.
- **Chen S, Zhu J, Zuo S, Ma J, Zhang J, Chen G, Wang X, Pan Y, Liu Y, Wang P.** 1,25(OH) $_2$ D $_3$ attenuates TGF- β 1/ β 2-induced increased migration and invasion via inhibiting epithelial-mesenchymal transition in colon cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Dec 4-11;468(1-2):130-5.
- **Chen X, Touyz RM, Park JB, Schiffrin EL.** Antioxidant effects of vitamins C and E are associated with altered activation of vascular NADPH oxidase and superoxide dismutase in stroke-prone SHR. *Hypertension.* 2001;38(3 Pt 2):606-11.
- **Cheng XW, Song H, Sasaki T, Hu L, Inoue A, Bando YK, Shi GP, Kuzuya M, Okumura K, Murohara T.** Angiotensin type 1 receptor blocker reduces intimal neovascularization and plaque growth in apolipoprotein E-deficient mice. *Hypertension.* 2011;57(5):981-9.
- **Chironi GN, Boulanger CM, Simon A, Dignat-George F, Freyssinet JM, Tedgui A.** Endothelial microparticles in diseases. *Cell Tissue Res.* 2009;335(1):143-51.
- **Chitalia N, Ismail T, Tooth L, Boa F, Hampson G, Goldsmith D, Kaski JC, Banerjee D.** Impact of vitamin D supplementation on arterial vasomotion, stiffness and endothelial biomarkers in chronic kidney disease patients. *PLoS One.* 2014;9(3):e91363.
- **Chobanian AV, Bakris GL, Black HR, Cushman WC, Green LA, Izzo JL Jr, Jones DW, Materson BJ, Oparil S, Wright JT Jr, Roccella EJ; Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. National Heart, Lung, and Blood Institute; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee.** Seventh report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure. *Hypertension.* 2003;42(6):1206-52.
- **Chokhandre MK, Mahmoud MI, Hakami T, Jafer M, Inamdhar AS.** Vitamin D & its analogues in type 2 diabetic nephropathy: a systematic review. *J Diabetes Metab Disord.* 2015;14:58.
- **Chow AK, Cena J, Schulz R.** Acute actions and novel targets of matrix metalloproteinases in the heart and vasculature. *Br J Pharmacol.* 2007;152(2):189-205.
- **Cook NR, Albert CM, Gaziano JM, Zaharris E, MacFadyen J, Danielson E, Buring JE, Manson JE.** A randomized factorial trial of vitamins C and E and beta carotene in the secondary prevention of cardiovascular events in women: results from the Women's Antioxidant Cardiovascular Study. *Arch Intern Med* 2007;167:1610–1618.

- **Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM.** Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science*. 2002;295(5564):2387-92.
- **Coutinho T, Turner ST, Kullo IJ.** Aortic pulse wave velocity is associated with measures of subclinical target organ damage. *JACC Cardiovasc Imaging*. 2011;4(7):754-61.
- **Cushman WC, Evans GW, Byington RP, Goff DC Jr, Grimm RH Jr, Cutler JA, Simons-Morton DG, Basile JN, Corson MA, Probstfield JL, Katz L, Peterson KA, Friedewald WT, Buse JB, Bigger JT, Gerstein HC, Ismail-Beigi F, ACCORD Study Group.** Effects of intensive blood-pressure control in type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med*. 2010;362(17):1575-85.
- **Dane MJ, van den Berg BM, Avramut MC, Faas FG, van der Vlag J, Rops AL, Ravelli RB, Koster BJ, van Zonneveld AJ, Vink H, Rabelink TJ.** Glomerular endothelial surface layer acts as a barrier against albumin filtration. *Am J Pathol*. 2013;182(5):1532-40.
- **Davies KJ, Sevanian A, Muakkassah-Kelly SF, Hochstein P.** Uric acid-iron ion complexes. A new aspect of the antioxidant functions of uric acid. *Biochem J*. 1986;235:747-754.
- **De Keulenaer GW, Alexander RW, Ushio-Fukai M, Ishizaka N, Griendling KK.** Tumour necrosis factor alpha activates a p22phox-based NADH oxidase in vascular smooth muscle. *Biochem J*. 1998;3:653-657.
- **de Lorenzo A, Salanova L, Bomback AS, Moya M, Coronel F, Bernis C, Sánchez-Tomero JA, Álvarez V.** Oral paricalcitol as antiproteinuric agent in chronic kidney disease. *Nefrologia*. 2013;33(5):709-15.
- **de Medeiros Cavalcante IG, Silva AS, Costa MJ, Persuhn DC, Issa CI, de Luna Freire TL, da Conceição Rodrigues Gonçalves M.** Effect of vitamin D3 supplementation and influence of BsmI polymorphism of the VDR gene of the inflammatory profile and oxidative stress in elderly women with vitamin D insufficiency: Vitamin D3 megadose reduces inflammatory markers. *Exp Gerontol*. 2015;66:10-6.
- **Deschamps AM, Spinale FG.** Pathways of matrix metalloproteinase induction in heart failure: bioactive molecules and transcriptional regulation. *Cardiovasc Res*. 2006;69(3):666-76.
- **Dobre D, Nimade S, de Zeeuw D.** Albuminuria in heart failure: what do we really know? *Curr Opin Cardiol*. 2009 Mar;24(2):148-54.
- **Dong J, Wong SL, Lau CW, Lee HK, Ng CF, Zhang L, Yao X, Chen ZY, Vanhoutte PM, Huang Y.** Calcitriol protects renovascular function in hypertension by down-regulating angiotensin II type 1 receptors and reducing oxidative stress. *Eur Heart J*. 2012;33(23):2980-90.
- **Dong Y, Stallmann-Jorgensen IS, Pollock NK, Harris RA, Keeton D, Huang Y, Li K, Bassali R, Guo DH, Thomas J, Pierce GL, White J, Holick MF, Zhu H.** A 16-week randomized clinical trial of 2000 international units daily vitamin D3 supplementation in black youth: 25-hydroxyvitamin D, adiposity, and arterial stiffness. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(10):4584-91.
- **Donnelly R, Collinson DJ, Manning G.** Hypertension, matrix metalloproteinases and target organ damage. *J Hypertens*. 2003;21(9):1627-30.
- **Doroudi R, Gan LM, Selin Sjogren L, Jern S.** Effects of shear stress on eicosanoid gene expression and metabolite production in vascular endothelium as studied in a novel biomechanical perfusion model. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;269:257-264

- **Dounousi E, Papavasiliou E, Makedou A, Ioannou K, Katopodis KP, Tselepis A, Siamopoulos KC, Tsakiris D.** Oxidative stress is progressively enhanced with advancing stages of CKD. *Am J Kidney Dis.* 2006;48(5):752-60.
- **Drechsler C, Pilz S, Obermayer-Pietsch B, Verduijn M, Tomaschitz A, Krane V, Espe K, Dekker F, Brandenburg V, März W, Ritz E, Wanner C.** Vitamin D deficiency is associated with sudden cardiac death, combined cardiovascular events, and mortality in haemodialysis patients. *Eur Heart J.* 2010;31(18):2253-61.
- **Duplancic D, Cesarik M, Poljak NK, Radman M, Kovacic V, Radic J, Rogosic V.** The influence of selective vitamin D receptor activator paricalcitol on cardiovascular system and cardiorenal protection. *Clin Interv Aging.* 2013;8:149-56.
- **Escudero P, Martinez de Marañón A, Collado A, Gonzalez-Navarro H, Hermenegildo C, Peiró C, Piqueras L, Sanz MJ.** Combined sub-optimal doses of rosuvastatin and bexarotene impair angiotensin II-induced arterial mononuclear cell adhesion through inhibition of Nox5 signaling pathways and increased RXR/PPAR α and RXR/PPAR γ interactions. *Antioxid Redox Signal.* 2015;22(11):901-20.
- **ESH/ESC Guidelines for the management of arterial hypertension.** *Journal of Hypertension* 2013;31:1281-1357.
- **Esteller A.** Biología de la pared vascular y síndrome metabólico. *Nutr Hosp.* 2005;1:5-17
- **Farquhar MG, Palade GE.** Glomerular permeability. II. Ferritin transfer across the glomerular capillary wall in nephrotic rats. *J Exp Med.* 1961;114:699-716.
- **Farquhar* MG, Wissig SL, Palade GE.** Glomerular permeability. I. Ferritin transfer across the normal glomerular capillary wall. *J Exp Med.* 1961;113:47-66.
- **Féletou M, Vanhoutte PM.** Endothelium-derived hyperpolarizing factor: Where are we now? *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1215-1225.
- **Fernández-Patrón C, Radomski MW, Davidge ST.** Vascular matrix metalloproteinase-2 cleaves big endothelin-1 yielding a novel vasoconstrictor. *Circ Res.* 1999;85(10):906-11.
- **Fields GB.** New strategies for targeting matrix metalloproteinases. *Matrix Biol.* 2015;44-46:239-46.
- **Finch JL, Suarez EB, Husain K, Ferder L, Cardema MC, Glenn DJ, Gardner DG, Liapis H, Slatopolsky E.** Effect of combining an ACE inhibitor and a VDR activator on glomerulosclerosis, proteinuria, and renal oxidative stress in uremic rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012;302(1):F141-9.
- **Fontana V, Silva PS, Gerlach RF, Tanus-Santos JE.** Circulating matrix metalloproteinases and their inhibitors in hypertension. *Clin Chim Acta.* 2012;413(7-8):656-62.
- **Foo JY, Wan Y, Schulz BL, Kostner K, Atherton J, Cooper-White J, Dimeski G, Punyadeera C.** Circulating fragments of N-terminal pro-B-type natriuretic peptides in plasma of heart failure patients. *Clin Chem.* 2013;59(10):1523-31.
- **Fortuño A, San José G, Moreno MU, Díez J, Zalba G.** Oxidative stress and vascular remodelling. *Ex Physiol.* 2005;90:457-462.
- **Fridovich I.** Superoxide dismutases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1974;41:35-97.

- **Fridovich I.** Superoxide dismutases. *Annu Rev Biochem.* 1975;44:147-159.
- **Fu X, Kao JL, Bergt C, Kassim SY, Huq NP, d'Avignon A, Parks WC, Mecham RP, Heinecke JW.** Oxidative cross-linking of tryptophan to glycine restrains matrix metalloproteinase activity: specific structural motifs control protein oxidation. *J Biol Chem.* 2004;279(8):6209-12.
- **Futrakul N, Sridama V, Futrakul P.** Microalbuminuria--a biomarker of renal microvascular disease. *Ren Fail.* 2009;31(2):140-3.
- **Gansevoort RT, Nauta FL, Bakker SJ.** Albuminuria: all you need to predict outcomes in chronic kidney disease? *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2010;19(6):513-8
- **Gansevoort RT, Correa-Rotter R, Hemmelgarn BR, Jafar TH, Heerspink HJ, Mann JF, Matsushita K, Wen CP.** Chronic kidney disease and cardiovascular risk: epidemiology, mechanisms, and prevention *Lancet.* 2013;382(9889):339-52.
- **García IM, Altamirano L, Mazzei L, Fornés M, Cuello-Carrión FD, Ferder L, Manucha W.** Vitamin D receptor-modulated Hsp70/AT1 expression may protect the kidneys of SHR at the structural and functional levels. *Cell Stress Chaperones.* 2014;19(4):479-91.
- **Garcia-Donaire JA, Segura J, Ruilope LM.** Clinical trials in nephrology: success or failure. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2007;16(2):59-63.
- **Geneser F.** Histología 3ª edición. Editorial Médica Panamericana.
- **George FD.** Microparticles in vascular diseases. *Thromb Res.* 2008;122 Suppl 1:S55-9
- **Georgescu A, Alexandru N, Andrei E, Titorencu I, Dragan E, Tarziu C, Ghiorghe S, Badila E, Bartos D, Popov D.** Circulating microparticles and endothelial progenitor cells in atherosclerosis: pharmacological effects of irbesartan. *J Thromb Haemost.* 2012;10(4):680-91.
- **Georgianos PI, Sarafidis PA, Lasaridis AN.** Arterial stiffness: a novel cardiovascular risk factor in kidney disease patients. *Curr Vasc Pharmacol.* 2015;13(2):229-38.
- **Gepner AD, Ramamurthy R, Krueger DC, Korcarz CE, Binkley N, Stein JH.** A prospective randomized controlled trial of the effects of vitamin D supplementation on cardiovascular disease risk. *PLoS One.* 2012;7(5):e36617.
- **Gil-Ortega M, García-Prieto CF, Ruiz-Hurtado G, Steireif C, González MC, Schulz A, Kreutz R, Fernández-Alfonso MS, Arribas S, Somoza B.** Genetic predisposition to albuminuria is associated with increased arterial stiffness: role of elastin. *Br J Pharmacol.* 2015;172(17):4406-18.
- **Goldberg S, Harvey SJ, Cunningham J, Tryggvason K, Miner JH.** Glomerular filtration is normal in the absence of both agrin and perlecan-heparan sulfate from the glomerular basement membrane. *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24(7):2044-51.
- **Gole HK, Tharp DL, Bowles DK.** Upregulation of intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels (KCNN4) in porcine coronary smooth muscle requires NADPH oxidase 5 (NOX5). *PLoS One.* 2014 Aug 21;9(8):e105337.
- **Gonzalez-Calero L, Martin-Lorenzo M, de la Cuesta F, Maroto AS, Baldan-Martin M, Ruiz-Hurtado G, Pulido-Olmo H, Segura J, Barderas MG, Ruilope LM, Vivanco F, Alvarez-Llamas G.** Urinary alpha-1

- antitrypsin and CD59 glycoprotein predict albuminuria development in hypertensive patients under chronic renin-angiotensin system suppression. *Cardiovasc Diabetol*. 2016;15(1):8.
- **Gorostidi M, Santamaría R, Alcázar R, Fernández-Fresnedo G, Galcerán JM, Goicoechea M, Oliveras A, Portolés J, Rubio E, Segura J, Aranda P, de Francisco AL, Del Pino MD, Fernández-Vega F, Górriz JL, Luño J, Marín R, Martínez I, Martínez-Castelao A, Orte LM, Quereda C, Rodríguez-Pérez JC, Rodríguez M, Ruilope LM.** Spanish Society of Nephrology document on KDIGO guidelines for the assessment and treatment of chronic kidney disease. *Nefrologia*. 2014;34(3):302-16.
 - **Grahammer F, Schell C, Huber TB.** The podocyte slit diaphragm—from a thin grey line to a complex signalling hub *Nature Reviews Nephrology* 2013;9:587-598
 - **Griendling KK, Alexander RW.** Endothelial control of the cardiovascular system:recent advances. *FASEB J*. 1996;10:283-292.
 - **Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW.** Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1994;74(6):1141-8.
 - **Griendling KK.** NADPH oxidases: new regulators of old functions. *Antioxid Redox Signal*. 2006;8:1443-1445.
 - **Gross J.** How tadpoles lose their tails: path to discovery of the first matrix metalloproteinase. *Matrix Biol*. 2004;23(1):3-13.
 - **Grote K, Flach I, Luchtefeld M, Akin E, Holland SM, Drexler H, Schieffer B.** Mechanical stretch enhances mRNA expression and proenzyme release of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) via NAD(P)H oxidase-derived reactive oxygen species. *Circ Res*. 2003;92(11):e80-6.
 - **Gschwend S, Pinto-Sietsma SJ, Buikema H, Pinto YM, van Gilst WH, Schulz A, de Zeeuw D, Kreutz R.** Impaired coronary endothelial function in a rat model of spontaneous albuminuria. *Kidney Int*. 2002;62(1):181-91
 - **Guidet BR, Shah SV.** In vivo generation of hydrogen peroxide by rat kidney cortex and glomeruli. *Am J Physiol*. 1989;256(1 Pt 2):F158-64.
 - **Guyton AC, Hall EJ.** Tratado de fisiología médica. Décima edición; 2005
 - **Haller H, Ito S, Izzo JL Jr, Januszewicz A, Katayama S, Menne J, Mimran A, Rabelink TJ, Ritz E, Ruilope LM, Rump LC, Viberti G; ROADMAP Trial Investigators.** Olmesartan for the delay or revention of microalbuminuria in type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2011;364(10):907-17.
 - **Haraldsson B, Nyström J, Deen WM.** Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiol Rev*. 2008;88(2):451-87.
 - **Harris RA, Pedersen-White J, Guo DH, Stallmann-Jorgensen IS, Keeton D, Huang Y, Shah Y, Zhu H, Dong Y.** Vitamin D3 supplementation for 16 weeks improves flow-mediated dilation in overweight African-American adults. *Am J Hypertens*. 2011;24(5):557-62.
 - **Hawkins CL, Morgan PE, Davies MJ.** Quantification of protein modification by oxidants. *Free Radic Biol Med*. 2009;46(8):965-88.
 - **Hayden MR, Chowdhury NA, Witte L, Sowers JR.** Microalbuminuria and proximal tubule remodeling in the cardiometabolic syndrome. *J Cardiometab Syndr*. 2006;1(2):107-14.

- **Hemmelgarn BR, Manns BJ, Lloyd A, James MT, Klarenbach S, Quinn RR, Wiebe N, Tonelli M; Alberta Kidney Disease Network.** Relation between kidney function, proteinuria, and adverse outcomes. *JAMA*. 2010 Feb 3;303(5):423-9.
- **Henry RM, Kostense PJ, Bos G, Dekker JM, Nijpels G, Heine RJ, Bouter LM, Stehouwer CD.** Mild renal insufficiency is associated with increased cardiovascular mortality: The Hoorn Study. *Kidney Int*. 2002;62(4):1402-7.
- **Herlan L, Unland J, Langer S, Schulte L, Schütten S, García-Prieto CF, Kossmehl P, Fernández-Alfonso MS, Schulz A, Kreutz R.** Development of progressive albuminuria in male Munich Wistar Frömter rats is androgen dependent. *Physiol Genomics*. 2015;47(7):281-9.
- **Hermans MM, Henry R, Dekker JM, Kooman JP, Kostense PJ, Nijpels G, Heine RJ, Stehouwer CD.** Estimated glomerular filtration rate and urinary albumin excretion are independently associated with greater arterial stiffness: the Hoorn Study. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18(6):1942-52.
- **Hillege HL, Fidler V, Diercks GF, van Gilst WH, de Zeeuw D, van Veldhuisen DJ, Gans RO, Janssen WM, Grobbee DE, de Jong PE, Prevention of Renal and Vascular End Stage Disease (PREVEND) Study Group-.** Urinary albumin excretion predicts cardiovascular and noncardiovascular mortality in general population. *Circulation*. 2002;106(14):1777-82.
- **Himmelfarb J, Ikizler TA, Ellis C, Wu P, Shintani A, Dalal S, Kaplan M, Chonchol M, Hakim RM.** Provision of antioxidant therapy in hemodialysis (PATH): a randomized clinical trial. *J Am Soc Nephrol* 2014;25:623–633.
- **Hironaka K, Makino H, Onbe T, Yamasaki Y, Shikata K, Kamata K, Ota Z.** Ultrastructural change of the glomerular basement membrane in rats with Heymann nephritis revealed by ultrahigh resolution scanning electron microscopy. *J Pathol*. 1996;179(1):112-20.
- **Hironaka K, Makino H, Yamasaki Y, Ota Z.** Pores in the glomerular basement membrane revealed by ultrahigh-resolution scanning electron microscopy. *Nephron*. 1993;64(4):647-9
- **Holick MF.** Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr*. 2004;80(6 Suppl):1678S-88S.
- **Hollenberg NK, Parving HH, Viberti G, Remuzzi G, Ritter S, Zelenkofske S, Kandra A, Daley WL, Rocha R.** Albuminuria response to very high-dose valsartan in type 2 diabetes mellitus. *J Hypertens*. 2007;25(9):1921-6.
- **Holterman CE, Thibodeau JF, Kennedy CR.** NADPH oxidase 5 and renal disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2015;24(1):81-7.
- **Holterman CE, Thibodeau JF, Towaij C, Gutsol A, Montezano AC, Parks RJ, Cooper ME, Touyz RM, Kennedy CR.** Nephropathy and elevated BP in mice with podocyte-specific NADPH oxidase 5 expression. *J Am Soc Nephrol*. 2014;25(4):784-97.
- **Hong HJ, Hsiao G, Cheng TH, Yen MH.** Supplementation with tetrahydrobiopterin suppresses the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 38:1044–1048, 2001.

- **Hou FF, Xie D, Zhang X, Chen PY, Zhang WR, Liang M, Guo ZJ, Jiang JP.** Renoprotection of Optimal Antiproteinuric Doses (ROAD) Study: a randomized controlled study of benazepril and losartan in chronic renal insufficiency. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(6):1889-98.
- **Howard SA, Hawkes WC.** The relative effectiveness of human plasma glutathione peroxidase as a catalyst for the reduction of hydroperoxides by glutathione. *Biol Trace Elem Res.* 1998;61:127-136.
- **Huang L, Yang L, Zhang S, Liu D, Yan X, Yan S.** Low-grade albuminuria associated with brachial-ankle pulse wave velocity in young adults with type 2 diabetes mellitus in China. *Diabetes Metab Res Rev.* 2015 Mar;31(3):262-8.
- **Huang Y, Cai X, Zhang J, Mai W, Wang S, Hu Y, Ren H, Xu D.** Prehypertension and Incidence of ESRD: a systematic review and meta-analysis. *Am J Kidney Dis.* 2014;63(1):76-83.
- **Husain K, Ferder L, Mizobuchi M, Finch J, Slatopolsky E.** Combination therapy with paricalcitol and enalapril ameliorates cardiac oxidative injury in uremic rats. *Am J Nephrol.* 2009;29(5):465-72.
- **Husain K, Suarez E, Isidro A, Ferder L.** Effects of paricalcitol and enalapril on atherosclerotic injury in mouse aortas. *Am J Nephrol.* 2010;32(4):296-304.
- **Ibrini J, Fadel S, Chana RS, Brunskill N, Wagner B, Johnson TS, El Nahas AM.** Albumin-induced epithelial mesenchymal transformation. *Nephron Exp Nephrol.* 2012;120(3):e91-102.
- **Ibsen H, Olsen MH, Wachtell K, Borch-Johnsen K, Lindholm LH, Mogensen CE, Dahlöf B, Devereux RB, de Faire U, Fyhrquist F, Julius S, Kjeldsen SE, Lederballe-Pedersen O, Nieminen MS, Omvik P, Oparil S, Wan Y.** Reduction in albuminuria translates to reduction in cardiovascular events in hypertensive patients: losartan intervention for endpoint reduction in hypertension study. *Hypertension.* 2005;45(2):198-202.
- **Ijpelaar DH, Schulz A, Koop K, Schlesener M, Bruijn JA, Kerjaschki D, Kreutz R, de Heer E.** Glomerular hypertrophy precedes albuminuria and segmental loss of podoplanin in podocytes in Munich-Wistar-Frömter rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008;294(4):758-67.
- **Inoue N, Takeshita S, Gao D, Ishida T, Kawashima S, Akita H, Tawa R, Sakurai H, Yokoyama M.** Lysophosphatidylcholine increases the secretion of matrix metalloproteinase 2 through the activation of NADH/NADPH oxidase in cultured aortic endothelial cells. *Atherosclerosis.* 2001;155(1):45-52.
- **Iseki K, Ikemiya Y, Iseki C, Takishita S.** Proteinuria and the risk of developing end-stage renal disease. *Kidney Int.* 2003;63(4):1468-74.
- **Iyer V, Pumiglia K, DiPersio CM.** Alpha3beta1 integrin regulates MMP-9 mRNA stability in immortalized keratinocytes: a novel mechanism of integrin-mediated MMP gene expression. *J Cell Sci.* 2005 Mar 15;118(Pt 6):1185-95.
- **Jacob-Ferreira AL, Schulz R.** Activation of intracellular matrix metalloproteinase-2 by reactive oxygen-nitrogen species: Consequences and therapeutic strategies in the heart. *Arch Biochem Biophys.* 2013;540(1-2):82-93.
- **Jacob-Ferreira* AL, Kondo MY, Baral PK, James MN, Holt A, Fan X, Schulz R.** Phosphorylation status of 72 kDa MMP-2 determines its structure and activity in response to peroxynitrite. *PLoS One.* 2013;8(8):e71794.

- **Jansen F, Yang X, Franklin BS, Hoelscher M, Schmitz T, Bedorf J, Nickenig G, Werner N.** High glucose condition increases NADPH oxidase activity in endothelial microparticles that promote vascular inflammation. *Cardiovasc Res.* 2013;98(1):94-106.
- **Jia G, Aroor AR, Sowers JR.** Arterial Stiffness: A Nexus between Cardiac and Renal Disease. *Cardiorenal Med.* 2014;4(1):60-71.
- **Jin Y, Han HC, Lindsey ML.** ACE inhibitors to block MMP-9 activity: new functions for old inhibitors. *J Mol Cell Cardiol.* 2007;43(6):664-6.
- **Jones G.** Expanding role for vitamin D in chronic kidney disease: importance of blood 25-OH-D levels and extra-renal 1 α -hydroxylase in the classical and nonclassical actions of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3). *Semin Dial.* 2007;20(4):316-24.
- **Kalaitzidis RG, Karasavvidou DP, Tatsioni A, Pappas K, Katatsis G, Lontos A, Elisaf MS.** Albuminuria as a marker of arterial stiffness in chronic kidney disease patients. *World J Nephrol.* 2015;4(3):406-14
- **Kaneko T, Shimizu A, Mii A, Fujita E, Fujino T, Kunugi S, Du X, Akimoto T, Tsuruoka S, Ohashi R, Masuda Y, Iino Y, Katayama Y, Fukuda Y.** Role of matrix metalloproteinase-2 in recovery after tubular damage in acute kidney injury in mice. *Nephron Exp Nephrol.* 2012;122(1-2):23-35.
- **Kashihara N, Watanabe Y, Makino H, Wallner EI, Kanwar YS.** Selective decreased de novo synthesis of glomerular proteoglycans under the influence of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(14):6309-13.
- **Katsuyama M.** NOX/NADPH oxidase, the superoxide-generating enzyme: its transcriptional regulation and physiological roles. *J Pharmacol Sci.* 2010;114(2):134-46.
- **Katusic ZS, Shepherd JT, Vanhoutte PM.** Endothelium-dependent contractions to calcium ionophore A23187, arachidonic acid and acetylcholine in canine basilar arteries. *Stroke* 1988;19:476-479.
- **Kim BJ, Lee HA, Kim NH, Kim MW, Kim BS, Kang JH.** The association of albuminuria, arterial stiffness, and blood pressure status in nondiabetic, nonhypertensive individuals. *J Hypertens.* 2011;29(11):2091-8.
- **Krivošíková Z, Gajdoš M, Šebeková K.** Vitamin D Levels Decline with Rising Number of Cardiometabolic Risk Factors in Healthy Adults: Association with Adipokines, Inflammation, Oxidative Stress and Advanced Glycation Markers. *PLoS One.* 2015;10(6):e0131753.
- **Kuthan H, Haussmann HJ, Werrigloer J.** A spectrophotometric assay for superoxide dismutase activities in crude tissue fractions. *Biochem J.* 1986;237(1):175-80
- **Kuwabara A, Satoh M, Tomita N, Sasaki T, Kashihara N.** Deterioration of glomerular endothelial surface layer induced by oxidative stress is implicated in altered permeability of macromolecules in Zucker fatty rats. *Diabetologia.* 2010;53(9):2056-65.
- **Lakatta EG, Levy D.** Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part I: aging arteries: a "set up" for vascular disease. *Circulation.* 2003;107(1):139-46.
- **Langille BL.** Remodeling of developing and mature arteries: endothelium, smooth muscle, and matrix. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993;21 Suppl 1:S11-7.

- **Lassegue B, Clempus RE.** Vascular NAD(P)H oxidases: specific features, expression, and regulation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003;285:R277-R297.
- **Laurent S, Boutouyrie P, Lacolley P.** Structural and genetic bases of arterial stiffness. *Hypertension.* 2005;45(6):1050-5.
- **Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L, Boutouyrie P, Giannattasio C, Hayoz D, Pannier B, Vlachopoulos C, Wilkinson I, Struijker-Boudier H; European Network for Non-invasive Investigation of Large Arteries.** Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J.* 2006;27(21):2588-605.
- **Laurent S, Cockcroft J, Van Bortel L, Boutouyrie P, Giannattasio C, Hayoz D, Pannier B, Vlachopoulos C, Wilkinson I, Struijker-Boudier H; European Network for Non-invasive Investigation of Large Arteries.** Expert consensus document on arterial stiffness: methodological issues and clinical applications. *Eur Heart J.* 2006;27(21):2588-605.
- **Lee JH, O'Keefe JH, Bell D, Hensrud DD, Holick MF.** Vitamin D deficiency an important, common, and easily treatable cardiovascular risk factor? *J Am Coll Cardiol.* 2008;52(24):1949-56.
- **Lee YH, Kweon SS, Choi JS, Rhee JA, Nam HS, Jeong SK, Park KS, Kim HY, Ryu SY, Choi SW, Kim BH, Shin MH.** Determining the optimal cut-off value of the urinary albumin-to-creatinine ratio to detect atherosclerotic vascular diseases. *Kidney Blood Press Res.* 2012;36(1):290-300.
- **Lennon R, Byron A, Humphries JD, Randles MJ, Carisey A, Murphy S, Knight D, Brenchley PE, Zent R, Humphries MJ.** Global analysis reveals the complexity of the human glomerular extracellular matrix. *J Am Soc Nephrol.* 2014 May;25(5):939-51.
- **Levey AS, Eckardt KU, Tsukamoto Y, Levin A, Coresh J, Rossert J, De Zeeuw D, Hostetter TH, Lameire N, Eknoyan G.** Definition and classification of chronic kidney disease: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* 2005;67(6):2089-100.
- **Lezza AM, Boffoli D, Scacco S, Cantatore P, Gadaleta MN.** Correlation between mitochondrial DNA 4977-bp deletion and respiratory chain enzyme activities in aging human skeletal muscles. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994;205:772-779.
- **Li H, Horke S, Förstermann U.** Vascular oxidative stress, nitric oxide and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 2014;237(1):208-19.
- **Li J, Xu L, Deng X, Jiang C, Pan C, Chen L, Han Y, Dai W, Hu L, Zhang G, Cheng Z, Liu WT.** N-acetyl-cysteine attenuates neuropathic pain by suppressing matrix metalloproteinases. *Pain.* 2016 Apr 8. En imprenta
- **Li SY, Huang PH, Yang AH, Tarng DC, Yang WC, Lin CC, Chen JW, Schmid-Schönbein G, Lin SJ.** Matrix metalloproteinase-9 deficiency attenuates diabetic nephropathy by modulation of podocyte functions and dedifferentiation. *Kidney Int.* 2014;86(2):358-69.
- **Li Y, Spataro BC, Yang J, Dai C, Liu Y.** 1,25-dihydroxyvitamin D inhibits renal interstitial myofibroblast activation by inducing hepatocyte growth factor expression. *Kidney Int.* 2005;68(4):1500-10.
- **Li YC, Kong J, Wei M, Chen ZF, Liu SQ, Cao LP.** 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J Clin Invest.* 2002;110(2):229-38.

- **Lieberman R, Wadwa RP, Nguyen N, Bishop FK, Reinick C, Snell-Bergeon JK, Maahs DM.** The association between vitamin D and vascular stiffness in adolescents with and without type 1 diabetes. *PLoS One*. 2013;8(10):e77272.
- **Lips P.** Worldwide status of vitamin D nutrition. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010;121(1-2):297-300.
- **Liu J, Yang F, Yang XP, Jankowski M, Pagano PJ.** NAD(P)H oxidase mediates angiotensin II-induced vascular macrophage infiltration and medial hypertrophy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;5:776-782.
- **Lods N, Ferrari P, Frey FJ, Kappeler A, Berthier C, Vogt B, Marti HP.** Angiotensin-converting enzyme inhibition but not angiotensin II receptor blockade regulates matrix metalloproteinase activity in patients with glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol*. 2003;14:2861–2872.
- **Lucisano S, Buemi M, Passantino A, Aloisi C, Cernaro V, Santoro D.** New insights on the role of vitamin D in the progression of renal damage. *Kidney Blood Press Res*. 2013;37(6):667-78.
- **Macconi D, Bonomelli M, Benigni A, Plati T, Sangalli F, Longaretti L, Conti S, Kawachi H, Hill P, Remuzzi G, Remuzzi A.** Pathophysiologic implications of reduced podocyte number in a rat model of progressive glomerular injury. *Am J Pathol*. 2006;168(1):42-54.
- **Macconi D, Ghilardi M, Bonassi ME, Mohamed EI, Abbate M, Colombi F, Remuzzi G, Remuzzi A.** Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on glomerular basement membrane permeability and distribution of zonula occludens-1 in MWF rats. *J Am Soc Nephrol*. 2000;11(3):477-89.
- **Macconi D, Sangalli F, Bonomelli M, Conti S, Condorelli L, Gagliardini E, Remuzzi G, Remuzzi A.** Podocyte repopulation contributes to regression of glomerular injury induced by ACE inhibition. *Am J Pathol*. 2009;174(3):797-807.
- **Madamanchi NR, Moon SK, Hakim ZS, Clark S, Mehrizi A, Patterson C, Runge MS.** Differential activation of mitogenic signaling pathways in aortic smooth muscle cells deficient in superoxide dismutase isoforms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25(5):950-6.
- **Manea A, Manea SA, Gan AM, Constantin A, Fenyo IM, Raicu M, Muresian H, Simionescu M.** Human monocytes and macrophages express NADPH oxidase 5; a potential source of reactive oxygen species in atherosclerosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;461(1):172-9.
- **Mannello F, Medda V.** Nuclear localization of matrix metalloproteinases. *Prog Histochem Cytochem*. 2012 Mar;47(1):27-58.
- **Marchesi C, Dentali F, Nicolini E, Maresca AM, Tayebjee MH, Franz M, Guasti L, Venco A, Schiffrin EL, Lip GY, Grandi AM.** Plasma levels of matrix metalloproteinases and their inhibitors in hypertension: a systematic review and meta-analysis. *J Hypertens*. 2012 Jan;30(1):3-16.
- **Martins D, Meng YX, Tareen N, Artaza J, Lee JE, Farodolu C, Gibbons G, Norris K.** The Effect of Short Term Vitamin D Supplementation on the Inflammatory and Oxidative Mediators of Arterial Stiffness. *Health (Irvine Calif)*. 2014;6(12):1503-1511.
- **Maschio G, Alberti D, Janin G, Locatelli F, Mann JF, Motolese M, Ponticelli C, Ritz E, Zucchelli P.** Effect of the angiotensin-converting-enzyme inhibitor benazepril on the progression of chronic renal

- insufficiency. The Angiotensin-Converting-Enzyme Inhibition in Progressive Renal Insufficiency Study Group. *N Engl J Med*. 1996;334(15):939-45.
- **Matsushita K, van der Velde M, Astor BC, Woodward M, Levey AS, de Jong PE, Coresh J, Gansevoort RT, Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium.** Association of estimated glomerular filtration rate and albuminuria with all-cause and cardiovascular mortality in general population cohorts: a collaborative meta-analysis. *Lancet*. 2010;375(9731):2073-81
 - **Matsushita K, Mahmoodi BK, Woodward M, Emberson JR, Jafar TH, Jee SH, Polkinghorne KR, Shankar A, Smith DH, Tonelli M, Warnock DG, Wen CP, Coresh J, Gansevoort RT, Hemmelgarn BR, Levey AS; Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium.** Comparison of risk prediction using the CKD-EPI equation and the MDRD study equation for estimated glomerular filtration rate. *JAMA*. 2012;307(18):1941-51.
 - **McCord JM, Fridovich I.** Superoxide dismutase: the first twenty years (1968-1988). *Free Radic BiolMed*.1988;5:363-369.
 - **Faraci FM, Didion SP.** Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:1367-1373.
 - **McKittrick IB, Bogaert Y, Nadeau K, Snell-Bergeon J, Hull A, Jiang T, Wang X, Levi M, Moulton KS.** Urinary matrix metalloproteinase activities: biomarkers for plaque angiogenesis and nephropathy in diabetes. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2011;301(6):F1326-33.
 - **Mennuni S, Rubattu S, Pierelli G, Tocci G, Fofi C, Volpe M.** Hypertension and kidneys: unraveling complex molecular mechanisms underlying hypertensive renal damage. *J Hum Hypertens*. 2014;28(2):74-9.
 - **Miner JH.** Glomerular basement membrane composition and the filtration barrier. *Pediatr Nephrol*. 2011;26(9):1413-7.
 - **Miner JH.** The glomerular basement membrane. *Exp Cell Res*. 2012;318(9):973-8.
 - **Mitchell GF, Hwang SJ, Vasan RS, Larson MG, Pencina MJ, Hamburg NM, Vita JA, Levy D, Benjamin EJ.** Arterial stiffness and cardiovascular events: the Framingham Heart Study. *Circulation*. 2010;121(4):505-11.
 - **Miyashita M, Koga K, Izumi G, Sue F, Makabe T, Taguchi A, Nagai M, Urata Y, Takamura M, Harada M, Hirata T, Hirota Y, Wada-Hiraike O, Fujii T, Osuga Y.** Effects of 1,25-dihydroxy vitamin D3 on endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016 Apr 1;jc20161515. [Epub ahead of print]
 - **Mogensen CE.** Microalbuminuria predicts clinical proteinuria and early mortality in maturity-onset diabetes. *N Engl J Med*. 1984;310(6):356-60.
 - **Mohamed EI, Fahmi NM, El Kholy SM, Sallam SM.** Effects of Reactive Oxygen Species on in vitro Filtration of Water and Albumin across Glomerular Basement Membrane. *Int J Biomed Sci*. 2006;2(2):121-34.
 - **Molina P, Górriz JL, Molina MD, Peris A, Beltrán S, Kanter J, Escudero V, Romero R, Pallardó LM.** The effect of cholecalciferol for lowering albuminuria in chronic kidney disease: a prospective controlled study. *Nephrol Dial Transplant*. 2014;29(1):97-109.

- **Montezano AC, Tsiropoulou S, Dulak-Lis M, Harvey A, Camargo Lde L, Touyz RM.** Redox signaling, Nox5 and vascular remodeling in hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2015;24(5):425-33.
- **Mulè G, Cottone S, Cusimano P, Palermo A, Geraci C, Nardi E, Castiglia A, Costanzo M, Cerasola G.** Unfavourable interaction of microalbuminuria and mildly reduced creatinine clearance on aortic stiffness in essential hypertension. *Int J Cardiol.* 2010;145(2):372-5.
- **Mulè G, Cottone S, Cusimano P, Riccobene R, Palermo A, Geraci C, Nardi E, Bellavia T, Foraci AC, Cerasola G.** The association of microalbuminuria with aortic stiffness is independent of C-reactive protein in essential hypertension. *Am J Hypertens.* 2009;22(10):1041-7.
- **Murphy G.** Tissue inhibitors of metalloproteinases. *Genome Biol.* 2011 Nov 11;12(11):233.
- **Nagase H, Visse R, Murphy G.** Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res.* 2006;69(3):562-73.
- **Nagasu H, Satoh M, Kiyokage E, Kidokoro K, Toida K, Channon KM, Kanwar YS, Sasaki T, Kashihara N.** Activation of endothelial NAD(P)H oxidase accelerates early glomerular injury in diabetic mice. *Lab Invest.* 2016;96(1):25-36.
- **Nakamura T, Ushiyama C, Suzuki S, Shimada N, Ohmuro H, Ebihara I, Koide H.** Effects of taurine and vitamin E on microalbuminuria, plasma metalloproteinase-9, and serum type IV collagen concentrations in patients with diabetic nephropathy. *Nephron.* 1999;83(4):361-2.
- **Nathan C, Cunningham-Bussel A.** Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(5):349-61.
- **National kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification and stratification.** *Am. J. kidney Dis.* 2002; 39(Suppl.1):S1-S266
- **Nerpin E, Helmersson-Karlqvist J, Risérus U, Sundström J, Larsson A, Jobs E, Basu S, Ingelsson E, Arnlöv J.** Inflammation, oxidative stress, glomerular filtration rate, and albuminuria in elderly men: a cross-sectional study. *BMC Res Notes.* 2012;5:537.
- **Nielsen KC, Owman C.** Contractile response and amine receptor mechanisms in isolated middle cerebral artery of the cat. *Brain Res.* 1971;27(1):33-42.
- **Nieuwdorp M, Mooij HL, Kroon J, Atasever B, Spaan JA, Ince C, Holleman F, Diamant M, Heine RJ, Hoekstra JB, Kastelein JJ, Stroes ES, Vink H.** Endothelial glycocalyx damage coincides with microalbuminuria in type 1 diabetes. *Diabetes.* 2006;55(4):1127-32.
- **Nigwekar SU, Thadhani R.** Vitamin D receptor activation: cardiovascular and renal implications. *Kidney Int Suppl (2011).* 2013;3(5):427-430.
- **Norman AW.** Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinology.* 2006;147(12):5542-8.
- **Norman PE, Powell JT.** Vitamin D and cardiovascular disease. *Circ Res.* 2014;114(2):379-93.
- **Oberg BP, McMenamin E, Lucas FL, McMonagle E, Morrow J, Ikizler TA, Himmelfarb J.** Increased prevalence of oxidant stress and inflammation in patients with moderate to severe chronic kidney disease. *Kidney Int.* 2004;65(3):1009-16.
- **OMS, WHO/DCO/WHO/2013.2; 2013**

- **OMS**, www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/; 2015.
- **Paravinci TM, Touyz RM**. NADPH oxidases, reactive oxygen species and hypertension. *Diabetes care*. 2008;31:S170-S180.
- **Parving HH, Mogensen CE, Jensen HA, Evrin PE**. Increased urinary albumin-excretion rate in benign essential hypertension. *Lancet*. 1974;1(7868):1190-2.
- **Peeters SA, Engelen L, Buijs J, Chaturvedi N, Fuller JH, Schalkwijk CG, Stehouwer CD; EURODIAB Prospective Complications Study Group**. Plasma levels of matrix metalloproteinase-2, -3, -10, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 are associated with vascular complications in patients with type 1 diabetes: the EURODIAB Prospective Complications Study. *Cardiovasc Diabetol*. 2015;10:14-31.
- **Perkovic V, Verdon C, Ninomiya T, Barzi F, Cass A, Patel A, Jardine M, Gallagher M, Turnbull F, Chalmers J, Craig J, Huxley R**. The relationship between proteinuria and coronary risk: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Med*. 2008;5(10):e207.
- **Peterson JT, Hallak H, Johnson L, Li H, O'Brien PM, Sliskovic DR, Bocan TM, Coker ML, Etoh T, Spinale FG**. Matrix metalloproteinase inhibition attenuates left ventricular remodeling and dysfunction in a rat model of progressive heart failure. *Circulation*. 2001;103(18):2303-9.
- **Piarulli F, Sartore G, Ceriello A, Ragazzi E, Reitano R, Nollino L, Cosma C, Fedele D, Lapolla A**. Relationship between glyco-oxidation, antioxidant status and microalbuminuria in type 2 diabetic patients. *Diabetologia*. 2009;52(7):1419-25.
- **Pieri C, Moroni F, Marra M, Marcheselli F, Recchioni R**. Melatonin is an efficient antioxidant. *Arch Gerontol Geriatr*. 1995;20:159-165.
- **Pilz S, Tomaschitz A, Ritz E, Pieber TR**. Vitamin D status and arterial hypertension: a systematic review. *Nat Rev Cardiol*. 2009;6(10):621-30.
- **Porth**. Fisiopatología, 7ª edición. Editorial Médica Panamericana.
- **Prabhakar S, Starnes J, Shi S, Lonis B, Tran R**. Diabetic nephropathy is associated with oxidative stress and decreased renal nitric oxide production. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18(11):2945-52.
- **Pu Q, Neves MF, Virdis A, Touyz RM, Schiffrin EL**. Endothelin antagonism on aldosterone-induced oxidative stress and vascular remodeling. *Hypertension*. 2003;1:49-55.
- **Purcell BP, Lobb D, Charati MB, Dorsey SM, Wade RJ, Zellars KN, Doviak H, Pettaway S, Logdon CB, Shuman JA, Freels PD, Gorman JH, Gorman RC, Spinale FG, Burdick JA**. Injectable and bioresponsive hydrogels for on-demand matrix metalloproteinase inhibition. *Nat Mater*. 2014;13(6):653-61.
- **Rabani J, Nielsen SO**. Absorption spectrum and decay kinetics of O₂⁻ and HO₂ in aqueous solutions by pulse radiolysis. *J Phys Chem*. 1969;73:3736-3744.
- **Rabelink TJ, de Zeeuw D**. The glycocalyx--linking albuminuria with renal and cardiovascular disease. *Nat Rev Nephrol*. 2015;11(11):667-76.
- **Rahman A, Hershey S, Ahmed S, Nibbelink K, Simpson RU**. Heart extracellular matrix gene expression profile in the vitamin D receptor knockout mice. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2007;103(3-5):416-9.

- **Rajagopalan S, Meng XP, Ramasamy S, Harrison DG, Galis ZS.** Reactive oxygen species produced by macrophage-derived foam cells regulate the activity of vascular matrix metalloproteinases in vitro. Implications for atherosclerotic plaque stability. *J Clin Invest.* 1996;98(11):2572-9.
- **Remuzzi A, Sangalli F, Macconi D, Tomasoni S, Cattaneo I, Rizzo P, Bonandrini B, Bresciani E, Longaretti L, Gagliardini E, Conti S, Benigni A, Remuzzi G.** Regression of Renal Disease by Angiotensin II Antagonism Is Caused by Regeneration of Kidney Vasculature. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27(3):699-705.
- **Remuzzi A, Gagliardini E, Donadoni C, Fassi A, Sangalli F, Lepre MS, Remuzzi G, Benigni A.** Effect of angiotensin II antagonism on the regression of kidney disease in the rat. *Kidney Int.* 2002;62(3):885-94.
- **Richart T, Li Y, Staessen JA.** Renal versus extrarenal activation of vitamin D in relation to atherosclerosis, arterial stiffening, and hypertension. *Am J Hypertens.* 2007;20(9):1007-15.
- **Rojas-Rivera J, Ortiz A, Egido J.** Antioxidants in kidney diseases: the impact of bardoxolone methyl. *Int J Nephrol.* 2012;2012:321714.
- **Rojas-Rivera J, De La Piedra C, Ramos A, Ortiz A, Egido J.** The expanding spectrum of biological actions of vitamin D. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25(9):2850-65.
- **Roth L, Rombouts M, Schrijvers DM, Martinet W, De Meyer GR.** Cholesterol-independent effects of atorvastatin prevent cardiovascular morbidity and mortality in a mouse model of atherosclerotic plaque rupture. *Vascul Pharmacol.* 2016;80:50-8.
- **Rothermund L, Lorenz M, Schnieber A, Eberson J, Bauhaus I, Bernhard Haug M, Schulz A, Keller F, Vetter R, Kreutz R.** Impact of nephron number dosing on cardiorenal damage and effects of ACE inhibition. *Am J Hypertens.* 2011;24(4):474-81.
- **Rude MK, Duhaney TA, Kuster GM, Judge S, Heo J, Colucci WS, Siwik DA, Sam F.** Aldosterone stimulates matrix metalloproteinases and reactive oxygen species in adult rat ventricular cardiomyocytes. *Hypertension.* 2005;46(3):555-61.
- **Ruggenenti P, Fassi A, Ilieva AP, Bruno S, Iliev IP, Brusegan V, Rubis N, Gherardi G, Arnoldi F, Ganeva M, Ene-Iordache B, Gaspari F, Perna A, Bossi A, Trevisan R, Dodesini AR, Remuzzi G; Bergamo Nephrologic Diabetes Complications Trial (BENEDICT) Investigators.** Preventing microalbuminuria in type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2004;351(19):1941-51.
- **Ruilope LM.** Current challenges in the clinical management of hypertension. *Nat Rev cardiol.* 2011;9(5):267-75.
- **Ruilope LM, Bakris GL.** Renal function and target organ damage in hypertension. *Eur Heart J.* 2011;32(13):1599-604.
- **Ruilope LM.** The kidney as a sensor of cardiovascular risk in essential hypertension. *J Am Soc Nephrol.* 2002;13 Suppl 3:S165-8.
- **Ruiz-Hurtado G, Condezo-Hoyos L, Pulido-Olmo H, Aranguéz I, Del Carmen González M, Arribas S, Cerezo C, Segura J, Praga M, Fernández-Alfonso MS, Ruilope LM.** Development of albuminuria and enhancement of oxidative stress during chronic renin-angiotensin system suppression. *J Hypertens.* 2014 Oct;32(10):2082-91.

- **Sachs N, Sonnenberg A.** Cell-matrix adhesion of podocytes in physiology and disease. *Nat Rev Nephrol.* 2013;9(4):200-10.
- **Sakamaki Y, Sasamura H, Hayashi K, Ishiguro K, Takaishi H, Okada Y, D'Armiento JM, Saruta T, Itoh H.** Absence of gelatinase (MMP-9) or collagenase (MMP-13) attenuates adriamycin-Induced Albuminuria and glomerulosclerosis. *Nephron Exp Nephrol.* 2010;115(2):e22-32
- **Salmon AH, Satchell SC.** Endothelial glycocalyx dysfunction in disease: albuminuria and increased microvascular permeability. *J Pathol.* 2012;226(4):562-74.
- **Salmon* AH, Ferguson JK, Burford JL, Gevorgyan H, Nakano D, Harper SJ, Bates DO, Peti-Peterdi J.** Loss of the endothelial glycocalyx links albuminuria and vascular dysfunction. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23(8):1339-50.
- **Salum E, Kampus P, Zilmer M, Eha J, Butlin M, Avolio AP, Põdramägi T, Arend A, Aunapuu M, Kals J.** Effect of vitamin D on aortic remodeling in streptozotocin-induced diabetes. *Cardiovasc Diabetol.* 2012;11:58.
- **Sarafidis PA, Li S, Chen SC, Collins AJ, Brown WW, Klag MJ, Bakris GL.** Hypertension awareness, treatment, and control in chronic kidney disease. *Am J Med.* 2008;121(4):332-40.
- **Satchell S.** The role of the glomerular endothelium in albumin handling. *Nat Rev Nephrol.* 2013;9(12):717-25.
- **Satchell SC, Tooke JE.** What is the mechanism of microalbuminuria in diabetes: a role for the glomerular endothelium? *Diabetologia.* 2008;51(5):714-25.
- **Satoh M.** Endothelial dysfunction as an underlying pathophysiological condition of chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol.* 2012;16(4):518-21.
- **Sato-Horiguchi C, Ogawa D, Wada J, Tachibana H, Koderä R, Eguchi J, Nakatsuka A, Terami N, Shikata K, Makino H.** Telmisartan attenuates diabetic nephropathy by suppressing oxidative stress in db/db mice. *Nephron Exp Nephrol.* 2012;121(3-4):e97-e108.
- **Sbardella D, Fasciglione GF, Gioia M, Ciaccio C, Tundo GR, Marini S, Coletta M.** Human matrix metalloproteinases: an ubiquitarian class of enzymes involved in several pathological processes. *Mol Aspects Med.* 2012;33(2):119-208.
- **Schulte L, Schulz A, Unland J, Schulz H, Hubner N, Schmidt-Ott KM, Kreutz R.** MWF rats with spontaneous albuminuria inherit a reduced efficiency of nephron induction during early nephrogenesis in comparison to SHR rats. *J Hypertens.* 2012;30(10):2031-8.
- **Schulz A, Hänsch J, Kuhn K, Schlesener M, Kossmehl P, Nyengaard JR, Wendt N, Huber M, Kreutz R.** Nephron deficit is not required for progressive proteinuria development in the Munich Wistar Frömter rat. *Physiol Genomics.* 2008;35(1):30-5.
- **Schulz A, Standke D, Kovacevic L, Mostler M, Kossmehl P, Stoll M, Kreutz R.** A major gene locus links early onset albuminuria with renal interstitial fibrosis in the MWF rat with polygenetic albuminuria. *J Am Soc Nephrol.* 2003;14(12):3081-9.
- **Schulz A, Kreutz R.** Mapping genetic determinants of kidney damage in rat models. *Hypertens Res.* 2012;35(7):675-94

- **Scott RP, Quaggin SE.** Review series: The cell biology of renal filtration. *J Cell Biol.* 2015 ;209(2):199-210.
- **Sedeek M, Gutsol A, Montezano AC, Burger D, Nguyen Dinh Cat A, Kennedy CR, Burns KD, Cooper ME, Jandeleit-Dahm K, Page P, Szyndralewicz C, Heitz F, Hebert RL, Touyz RM.** Renoprotective effects of a novel Nox1/4 inhibitor in a mouse model of Type 2 diabetes. *Clin Sci (Lond).* 2013;124(3):191-202.
- **Segura J, Campo C, Gil P, Roldán C, Vigil L, Rodicio JL, Ruilope LM.** Development of chronic kidney disease and cardiovascular prognosis in essential hypertensive patients. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15(6):1616-22.
- **Segura J, Ruilope LM.** Minor abnormalities of renal function: a situation requiring integrated management of cardiovascular risk. *Fundam Clin Pharmacol.* 2005;19(4):429-37.
- **Segura J, García-Donaire JA, Praga M, Ruilope LM.** Chronic kidney disease as a situation of high added risk in hypertensive patients. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(4 Suppl 2):S136-40.
- **Segura J, Ruilope LM.** Hypertension in moderate-to-severe nondiabetic CKD patients. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2011;18(1):23-7.
- **Şeker T, Gür M, Kuloğlu O, Kalkan GY, Şahin DY, Türkoğlu C, Elbasan Z, Baykan AO, Gözübüyük G, Çaylı M.** Serum 25-hydroxyvitamin D is associated with both arterial and ventricular stiffness in healthy subjects. *J Cardiol.* 2013;62(6):361-5.
- **Sela-Passwell N, Kikkeri R, Dym O, Rozenberg H, Margalit R, Arad-Yellin R, Eisenstein M, Brenner O, Shoham T, Danon T, Shanzer A, Sagi I.** Antibodies targeting the catalytic zinc complex of activated matrix metalloproteinases show therapeutic potential. *Nat Med.* 2011;18(1):143-7.
- **Seo DW, Li H, Guedez L, Wingfield PT, Diaz T, Salloum R, Wei BY, Stetler-Stevenson WG.** TIMP-2 mediated inhibition of angiogenesis: an MMP-independent mechanism. *Cell.* 2003;114(2):171-80.
- **Shannon MB, Patton BL, Harvey SJ, Miner JH.** A hypomorphic mutation in the mouse laminin alpha5 gene causes polycystic kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17(7):1913-22.
- **Shantsila E, Kamphuisen PW, Lip GY.** Circulating microparticles in cardiovascular disease: implications for atherogenesis and atherothrombosis. *J Thromb Haemost.* 2010;8(11):2358-68.
- **Shi Y, Vanhoutte PM.** Oxidative stress and COX cause hyper-responsiveness in vascular smooth muscle of the femoral artery from diabetic rats. *Br J Pharmacol.* 2008;154:639-651
- **Shi Y, Lo CS, Chenier I, Maachi H, Filep JG, Ingelfinger JR, Zhang SL, Chan JS.** Overexpression of catalase prevents hypertension and tubulointerstitial fibrosis and normalization of renal angiotensin-converting enzyme-2 expression in Akita mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2013;304(11):F1335-46.
- **Shinohara M, Adachi Y, Mitsushita J, Kuwabara M, Nagasawa A, Harada S, Furuta S, Zhang Y, Seheli K, Miyazaki H, Kamata T.** Reactive oxygen generated by NADPH oxidase 1 (Nox1) contributes to cell invasion by regulating matrix metalloproteinase-9 production and cell migration. *J Biol Chem.* 2010;285(7):4481-8.
- **Singh A, Ramnath RD, Foster RR, Wylie EC, Fridén V, Dasgupta I, Haraldsson B, Welsh GI, Mathieson PW, Satchell SC.** Reactive oxygen species modulate the barrier function of the human glomerular endothelial glycocalyx. *PLoS One.* 2013;8(2):e55852.

- **Smyth N, Vatansever HS, Murray P, Meyer M, Frie C, Paulsson M, Edgar D.** Absence of basement membranes after targeting the LAMC1 gene results in embryonic lethality due to failure of endoderm differentiation. *J Cell Biol.* 1999;144(1):151-60.
- **Somoza B, González MC, González JM, Abderrahim F, Arribas S, Fernández-Alfonso MS.** Modulatory role of the adventicia on noradrenaline and angiotensin II responses. Role of endothelium and AT₂ receptors. *Cardiovasc Res.* 2005;65:478-486.
- **Sonneveld R, Hoenderop JG, Stavenuiter AW, Ferrantelli E, Baltissen MP, Dijkman HB, Florquin S, Rops AL, Wetzels JF, Berden JH, van der Vlag J, Nijenhuis T.** 1,25-Vitamin D3 Deficiency Induces Albuminuria. *Am J Pathol.* 2016 Apr;186(4):794-804.
- **Souza AC, Yuen PS, Star RA.** Microparticles: markers and mediators of sepsis-induced microvascular dysfunction, immunosuppression, and AKI. *Kidney Int.* 2015;87(6):1100-8.
- **Springman EB, Angleton EL, Birkedal-Hansen H, Van Wart HE.** Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(1):364-8.
- **St John PL, Abrahamson DR.** Glomerular endothelial cells and podocytes jointly synthesize laminin-1 and -11 chains. *Kidney Int.* 2001;60(3):1037-46
- **Steireif C, García-Prieto CF, Ruiz-Hurtado G, Pulido-Olmo H, Aranguéz I, Gil-Ortega M, Somoza B, Schönfelder G, Schulz A, Fernández-Alfonso MS, Kreutz R.** Dissecting the genetic predisposition to albuminuria and endothelial dysfunction in a genetic rat model. *J Hypertens.* 2013;31(11):2203-12.
- **Stocker R, Keaney JF Jr.** New insights on oxidative stress in the artery wall. *J Thromb Haemost.* 2005;3:1825-1834.
- **Stricker H, Tosi Bianda F, Guidicelli-Nicolosi S, Limoni C, Colucci G.** Effect of a single, oral, high-dose vitamin D supplementation on endothelial function in patients with peripheral arterial disease: a randomised controlled pilot study. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2012;44(3):307-12.
- **Strippoli GF, Navaneethan SD, Johnson DW, Perkovic V, Pellegrini F, Nicolucci A, Craig JC.** Effects of statins in patients with chronic kidney disease: meta-analysis and meta-regression of randomised controlled trials. *BMJ.* 2008;336(7645):645-51.
- **Sugden JA, Davies JI, Witham MD, Morris AD, Struthers AD.** Vitamin D improves endothelial function in patients with Type 2 diabetes mellitus and low vitamin D levels. *Diabet Med.* 2008;25(3):320-5.
- **Suh JH, Miner JH.** The glomerular basement membrane as a barrier to albumin. *Nat Rev Nephrol.* 2013;9(8):470-7.
- **Szasz T, Thakali K, Fink GC, Watts SW.** A comparison of arteries and veins in oxidative stress: producers, destroyers, function and disease. *Exp Biol Med (Maywood).* 2007;232(1):27-37.
- **Takenaka T, Inoue T, Ohno Y, Miyazaki T, Nishiyama A, Ishii N, Suzuki H.** Calcitriol supplementation improves endothelium-dependent vasodilation in rat hypertensive renal injury. *Kidney Blood Press Res.* 2014;39(1):17-27.
- **Tan RJ, Liu Y.** Matrix metalloproteinases in kidney homeostasis and diseases. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2012;302(11):F1351-61.

- **Tan RJ, Zhou D, Xiao L, Zhou L, Li Y, Bastacky SI, Oury TD, Liu Y.** Extracellular Superoxide Dismutase Protects against Proteinuric Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26(10):2447-59.
- **Taraboletti G, D'Ascenzo S, Borsotti P, Giavazzi R, Pavan A, Dolo V.** Shedding of the matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9, and MT1-MMP as membrane vesicle-associated components by endothelial cells. *Am J Pathol.* 2002;160(2):673-80
- **Tare M, Emmett SJ, Coleman HA, Skordilis C, Eyles DW, Morley R, Parkinson HC.** Vitamin D insufficiency is associated with impaired vascular endothelial and smooth muscle function and hypertension in young rats. *J Physiol.* 2011;589(Pt 19):4777-86.
- **Tayebjee MH, Lip GY, Tan KT, Patel JV, Hughes EA, MacFadyen RJ.** Plasma matrix metalloproteinase-9, tissue inhibitor of metalloproteinase-2, and CD40 ligand levels in patients with stable coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 2005;96(3):339-45.
- **Tenten V, Menzel S, Kunter U, Sicking EM, van Roeyen CR, Sanden SK, Kaldenbach M, Boor P, Fuss A, Uhlig S, Lanzmich R, Willemsen B, Dijkman H, Grepl M, Wild K, Kriz W, Smeets B, Floege J, Moeller MJ.** Albumin is recycled from the primary urine by tubular transcytosis. *J Am Soc Nephrol.* 2013;24(12):1966-80.
- **Thrall KM, Moreau CS, Cockrell GE, Jo CH, Bunn RC, Morales-Pozzo AE, Lumpkin CK, Fowlkes JL.** Disease and gender-specific dysregulation of NGAL and MMP-9 in type 1 diabetes mellitus. *Endocrine.* 2010;37(2):336-43.
- **Timms PM, Mannan N, Hitman GA, Noonan K, Mills PG, Syndercombe-Court D, Aganna E, Price CP, Boucher BJ.** Circulating MMP9, vitamin D and variation in the TIMP-1 response with VDR genotype: mechanisms for inflammatory damage in chronic disorders? *QJM.* 2002;95(12):787-96.
- **Tocchi A, Parks WC.** Functional interactions between matrix metalloproteinases and glycosaminoglycans. *FEBS J.* 2013;280(10):2332-41.
- **Touyz RM, Chen X, He G, Quinn MT, Schiffrin EL.** Expression of a gp91phox-containing leukocyte-type NADPH oxidase in human vascular smooth muscle cells-modulation by Ang II. *Circ Res.* 2002; 90:1205-1213.
- **Touyz RM, Tabet F, Schiffrin EL.** Redox dependent signalling by angiotensin II and vascular remodelling. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2003;30(11):860-6.
- **Tsai JP, Liou JH, Kao WT, Wang SC, Lian JD, Chang HR.** Increased expression of intranuclear matrix metalloproteinase 9 in atrophic renal tubules is associated with renal fibrosis. *PLoS One.* 2012;7(10):e48164.
- **Tsubaki M, Takeda T, Kino T, Obata N, Itoh T, Imano M, Mashimo K, Fujiwara D, Sakaguchi K, Satou T, Nishida S.** Statins improve survival by inhibiting spontaneous metastasis and tumor growth in a mouse melanoma model. *Am J Cancer Res.* 2015;5(10):3186-97.
- **Tuñón J, Cristóbal C, Tarín N, Aceña Á, González-Casaus ML, Huelmos A, Alonso J, Lorenzo Ó, González-Parra E, Mahillo-Fernández I, Pello AM, Carda R, Farré J, Rodríguez-Artalejo F, López-Bescós L, Egido J.** Coexistence of low vitamin D and high fibroblast growth factor-23 plasma levels predicts an adverse outcome in patients with coronary artery disease. *PLoS One.* 2014;9(4):e95402.

- **Uberti F, Lattuada D, Morsanuto V, Nava U, Bolis G, Vacca G, Squarzanti DF, Cisari C, Molinari C.** Vitamin D protects human endothelial cells from oxidative stress through the autophagic and survival pathways. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(4):1367-74.
- **Ulu N, Schoemaker RG, Henning RH, Buikema H, Teerlink T, Zijlstra FJ, Bakker SJ, van Gilst WH, Navis G.** Proteinuria-associated endothelial dysfunction is strain dependent. *Am J Nephrol.* 2009;30(3):209-17.
- **Ungvari Z, Csiszar A, Huang A, Kaminski PM, Wolin MS, Koller A.** High pressure induces superoxide production in isolated arteries via protein kinase C-dependent activation of NAD(P)H oxidase. *Circulation.* 2003;108:1253-1258.
- **Valcheva P, Cardus A, Panizo S, Parisi E, Bozic M, Lopez Novoa JM, Dusso A, Fernández E, Valdivielso JM.** Lack of vitamin D receptor causes stress-induced premature senescence in vascular smooth muscle cells through enhanced local angiotensin-II signals. *Atherosclerosis.* 2014;235(2):247-55.
- **Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and cell biology.* 2007;39: 44-84.
- **van den Hoven MJ, Wijnhoven TJ, Li JP, Zcharia E, Dijkman HB, Wismans RG, Rops AL, Lensen JF, van den Heuvel LP, van Kuppevelt TH, Vlodavsky I, Berden JH, van der Vlag J.** Reduction of anionic sites in the glomerular basement membrane by heparanase does not lead to proteinuria. *Kidney Int.* 2008 Feb;73(3):278-87.
- **van der Velde M, Halbesma N, de Charro FT, Bakker SJ, de Zeeuw D, de Jong PE, Gansevoort RT.** Screening for albuminuria identifies individuals at increased renal risk. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(4):852-62.
- **van Es N, Schulz A, Ijpelaar D, van der Wal A, Kuhn K, Schütten S, Kossmehl P, Nyengaard JR, de Heer E, Kreutz R.** Elimination of severe albuminuria in aging hypertensive rats by exchange of 2 chromosomes in double-consomic rats. *Hypertension.* 2011;58(2):219-24.
- **Vandooren J, Van den Steen PE, Opdenakker G.** Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9): the next decade. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2013;48(3):222-72.
- **Vasan RS, Larson MG, Leip EP, Evans JC, O'Donnell CJ, Kannel WB, Levy D.** Impact of high-normal blood pressure on the risk of cardiovascular disease. *N Engl J Med.* 2001;345(18):1291-7.
- **Vaziri ND, Ni Z, Oveisi F, Liang K, Pandian R.** Enhanced nitric oxide inactivation and protein nitration by reactive oxygen species in renal insufficiency. *Hypertension.* 2002;39(1):135-41.
- **Verhave JC, Gansevoort RT, Hillege HL, Bakker SJ, De Zeeuw D, de Jong PE; PREVEND Study Group.** An elevated urinary albumin excretion predicts de novo development of renal function impairment in the general population. *Kidney Int Suppl.* 2004;(92):S18-21.
- **Viazzi F, Bonino B, Cappadona F, Pontremoli R.** Renin-angiotensin-aldosterone system blockade in chronic kidney disease: current strategies and a look ahead. *Intern Emerg Med.* 2016 Mar 17. [Epub ahead of print]

- **Vlahu CA, Lemkes BA, Struijk DG, Koopman MG, Krediet RT, Vink H.** Damage of the endothelial glycocalyx in dialysis patients. *J Am Soc Nephrol.* 2012 Nov;23(11):1900-8.
- **Wachtell K, Ibsen H, Olsen MH, Borch-Johnsen K, Lindholm LH, Mogensen CE, Dahlöf B, Devereux RB, Beevers G, de Faire U, Fyhrquist F, Julius S, Kjeldsen SE, Kristianson K, Lederballe-Pedersen O, Nieminen MS, Okin PM, Omvik P, Oparil S, Wedel H, Snapinn SM, Aurup P.** Albuminuria and cardiovascular risk in hypertensive patients with left ventricular hypertrophy: the LIFE study. *Ann Intern Med.* 2003;139(11):901-6.
- **Wadei HM, Textor SC.** The role of the kidney in regulating arterial blood pressure. *Nat Rev Nephrol.* 2012;8(10):602-9
- **Wahid F, Shehzad A, Khan T, Kim YY.** MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1803(11):1231-43.
- **Waller H, Chatterji U, Gallay P, Parkinson T, Targett-Adams P.** The use of AlphaLISA technology to detect interaction between hepatitis C virus-encoded NS5A and cyclophilin A. *J Virol Methods.* 2010;165(2):202-10.
- **Wan Y, Xhang X, Atherton JJ, Kostner K, Dimeski G, Punyadeera C.** A multimarker approach to diagnose and stratify heart failure. *Int J Cardiol.* 2015;181:369-75.
- **Wang H, Chen X, Su Y, Paueksakon P, Hu W, Zhang MZ, Harris RC, Blackwell TS, Zent R, Pozzi A.** p47(phox) contributes to albuminuria and kidney fibrosis in mice. *Kidney Int.* 2015;87(5):948-62.
- **Wang H, Lafdil F, Wang L, Yin S, Feng D, Gao B.** Tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) deficiency exacerbates carbon tetrachloride-induced liver injury and fibrosis in mice: involvement of hepatocyte STAT3 in TIMP-1 production. *Cell Biosci.* 2011;1(1):14.
- **Wang M, Zhang J, Telljohann R, Jiang L, Wu J, Monticone RE, Kapoor K, Talan M, Lakatta EG.** Chronic matrix metalloproteinase inhibition retards age-associated arterial proinflammation and increase in blood pressure. *Hypertension.* 2012;60(2):459-66.
- **Wang Y, Rosen H, Madtes DK, Shao B, Martin TR, Heinecke JW, Fu X.** Myeloperoxidase inactivates TIMP-1 by oxidizing its N-terminal cysteine residue: an oxidative mechanism for regulating proteolysis during inflammation. *J Biol Chem.* 2007;282(44):31826-34.
- **Wang Z, Famulski K, Lee J, Das SK, Wang X, Halloran P, Oudit GY, Kassiri Z.** TIMP2 and TIMP3 have divergent roles in early renal tubulointerstitial injury. *Kidney Int.* 2014;85(1):82-93.
- **Wang* M, Kim SH, Monticone RE, Lakatta EG.** Matrix metalloproteinases promote arterial remodeling in aging, hypertension, and atherosclerosis. *Hypertension.* 2015;65(4):698-703.
- **Wasse H, Cardarelli F, De Staercke C, Hooper C, Veledar E, Guessous I.** 25-hydroxyvitamin D concentration is inversely associated with serum MMP-9 in a cross-sectional study of African American ESRD patients. *BMC Nephrol.* 2011;12:24.
- **Widder JD, Chen W, Li L, Dikalov S, Thöny B, Hatakeyama K, Harrison DG.** Regulation of tetrahydrobiopterin biosynthesis by shear stress. *Circ Res.* 2007 Oct 12;101(8):830-8.

- **Wingler K, Wünsch S, Kreutz R, Rothermund L, Paul M, Schmidt HH.** Upregulation of the vascular NAD(P)H-oxidase isoforms Nox1 and Nox4 by the renin-angiotensin system in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med.* 2001;31(11):1456-64.
- **Woodard T, Sigurdsson S, Gotal JD, Torjesen AA, Inker LA, Aspelund T, Eiriksdottir G, Gudnason V, Harris TB, Launer LJ, Levey AS, Mitchell GF.** Mediation analysis of aortic stiffness and renal microvascular function. *J Am Soc Nephrol.* 2015;26(5):1181-7.
- **Wu KI, Schmid-Schönbein GW.** Nuclear factor kappa B and matrix metalloproteinase induced receptor cleavage in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension.* 2011;57(2):261-8.
- **Wu-Wong JR.** Potential for vitamin D receptor agonists in the treatment of cardiovascular disease. *Br J Pharmacol.* 2009;158(2):395-412.
- **Yabluchanskiy A, Ma Y, Iyer RP, Hall ME, Lindsey ML.** Matrix metalloproteinase-9: Many shades of function in cardiovascular disease. *Physiology (Bethesda).* 2013;28(6):391-403.
- **Yamamoto K, Murphy G, Troeberg L.** Extracellular regulation of metalloproteinases. *Matrix Biol.* 2015 May-Jul;44-46:255-63.
- **Yang HC, Liu SJ, Fogo AB.** Kidney regeneration in mammals. *Nephron Exp Nephrol.* 2014;126(2):50.
- **Yang Y, Candelario-Jalil E, Thompson JF, Cuadrado E, Estrada EY, Rosell A, Montaner J, Rosenberg GA.** Increased intranuclear matrix metalloproteinase activity in neurons interferes with oxidative DNA repair in focal cerebral ischemia. *J Neurochem.* 2010;112(1):134-49.
- **Yasmin, McEniery CM, Wallace S, Dakham Z, Pulsalkar P, Maki-Petaja K, Ashby MJ, Cockcroft JR, Wilkinson IB.** Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2, and serum elastase activity are associated with systolic hypertension and arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(2):372-8.
- **Yu P, Han W, Villar VA, Yang Y, Lu Q, Lee H, Li F, Quinn MT, Gildea JJ, Felder RA, Jose PA.** Unique role of NADPH oxidase 5 in oxidative stress in human renal proximal tubule cells. *Redox Biol.* 2014;2:570-9.
- **Zanchetti A, Hansson L, Dahlöf B, Elmfeldt D, Kjeldsen S, Kolloch R, Larochelle P, McInnes GT, Mallion JM, Ruilope L, Wedel H.** Effects of individual risk factors on the incidence of cardiovascular events in the treated hypertensive patients of the Hypertension Optimal Treatment Study. HOT Study Group. *J Hypertens.* 2001;19(6):1149-59.
- **Zhang C, Meng Y, Liu Q, Xuan M, Zhang L, Deng B, Zhang K, Liu Z, Lei T.** Injury to the endothelial surface layer induces glomerular hyperfiltration rats with early-stage diabetes. *J Diabetes Res.* 2014;2014:953740.
- **Zhang* XL, Guo YF, Song ZX, Zhou M.** Vitamin D prevents podocyte injury via regulation of macrophage M1/M2 phenotype in diabetic nephropathy rats. *Endocrinology.* 2014;155(12):4939-50.
- **Zhang Z, Sun L, Wang Y, Ning G, Minto AW, Kong J, Quigg RJ, Li YC.** Renoprotective role of the vitamin D receptor in diabetic nephropathy. *Kidney Int.* 2008;73(2):163-71.
- **Zhang* Z, Zhang Y, Ning G, Deb DK, Kong J, Li YC.** Combination therapy with AT1 blocker and vitamin D analog markedly ameliorates diabetic nephropathy: blockade of compensatory renin increase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Oct 14;105(41):15896-901.

- **Zhong W, Gu B, Gu Y, Groome LJ, Sun J, Wang Y.** Activation of vitamin D receptor promotes VEGF and CuZn-SOD expression in endothelial cells. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2014;140:56-62.
- **Zhou G, Cheung AK, Liu X, Huang Y.** Valsartan slows the progression of diabetic nephropathy in db/db mice via a reduction in podocyte injury, and renal oxidative stress and inflammation. *Clin Sci (Lond).* 2014;126(10):707-20.
- **Zou M.** Arterial stiffness: a brief review Najeeb A SHIRWANY, *Acta Pharmacologica Sinica* (2010) 31: 1267–1276.

ANEXO

Publicaciones derivadas de esta Tesis Doctoral

